

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66716 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09,
15/12, 15/55, 9/22, 1/21, C12Q 1/68, 1/02, C07K 16/40,
A61K 38/46, 39/395, 31/711167-0052 東京都杉並区南荻窪4-8-13 Tokyo (JP). 中村
祐輔 (NAKAMURA, Yusuke) [JP/JP]; 〒225-0011 神奈川県
横浜横浜市青葉区あざみ野1-17-33 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01720

(74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.)
; 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日
殖ビル8階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001年3月6日 (06.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-61464 2000年3月7日 (07.03.2000) JP
特願2000-208610 2000年7月10日 (10.07.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番
1号 Tokyo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 宮地宏昌
(MIYAJI, Hiromasa) [JP/JP]. 春岡素子 (HARUOKA,
Motoko) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下
土狩1188 協和醗酵工業株式会社 医薬総合研究所内
Shizuoka (JP). 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]. 川端彩
子 (KAWABATA, Ayako) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町
田市旭町3-6-6 協和醗酵工業株式会社 東京研究所
内 Tokyo (JP). 菅野純夫 (SUGANO, Sumio) [JP/JP]; 〒

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: POLYPEPTIDE HAVING PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY

WO 01/66716 A1

(54) 発明の名称: ホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチド

(57) Abstract: Novel polypeptide having a PDE activity; a process for producing this polypeptide; a DNA encoding this polypeptide; a recombinant vector obtained by integrating this polypeptide; a transformant carrying this recombinant vector; an antibody recognizing the above polypeptide; a method of quantifying the polypeptide and an immunological staining method by using this antibody; a method of screening a substance changing the expression of a gene encoding the above polypeptide; a method of screening a substance changing the activity of the polypeptide; and drugs, etc. for diagnosing, preventing or treating diabetes, brain diseases, kidney diseases, cancer, etc. by using the above DNA or the above antibody. Use of the DNA of the novel PDE polypeptide enables diagnosis, prevention and treatment of diabetes, ischemic heart diseases, hypertension, nephritis, pancreatitis, ulcer, allergy, asthma, rheumatism, osteoporosis, pain, anxiety, schizophrenia, manic-depressive psychosis, Parkinson's disease, dementia, infectious diseases, malignant tumor, etc.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

本発明によれば、PDE活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを組み込んで得られる組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法および該DNAあるいは該抗体を用いた糖尿病、脳疾患、腎疾患または癌等の疾患の診断、予防または治療のための医薬等が提供される。本発明により得られる新規PDEポリペプチドのDNAを用いることにより、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症、悪性腫瘍等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

明細書

ホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチド

技術分野

本発明は、新規ホスホジエステラーゼポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ホスホジエステラーゼポリペプチドの製造方法に関する。本発明はまた、該ポリペプチドの利用方法、例えば、該ポリペプチドまたはその抗体を用いたアゴニスト又はアンタゴニスト活性を有する化合物のスクリーニング方法、並びに該ポリペプチド又はその抗体を含む医薬に関する。

背景技術

環状ヌクレオチドはG蛋白質共役型受容体（GPCR）からの刺激をはじめとする多くの細胞外刺激による細胞応答を仲介することが知られている。環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ（PDE）は、3'，5'-環状アデノシンモノホスフェート（cAMP）および3'，5'-環状グアノシンモノホスフェート（cGMP）などの3'，5'-環状ヌクレオチドを加水分解し、対応するヌクレオシド5'モノホスフェートを生成することで細胞内のこれらの環状ヌクレオチドの濃度調節に重要な役割を果たしている〔Pharmac. Ther., 51, 13 (1991)〕。すなわち、PDEは、細胞内の定常状態でのcAMPおよびcGMP濃度、さらには環状ヌクレオチドを介したシグナルの大きさおよび持続時間を調節している。多くの実験結果よりPDE活性は他のシグナル伝達系からの多種類の情報により制御されていることが示されており、シグナル伝達経路間の“cross-talk”および細胞内制御ネットワークの重要な位置を占めている〔Trend. Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)、Arch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)、及びEndocrinol. Rev., 16, 370 (1995)〕。

脊椎動物のPDEは構造、局在、制御、選択的PDE阻害剤に対する感受性等

の異なるサブタイプおよびそれらのアイソフォームからなる大きなスーパーファミリーを形成している〔Trend. Pharmacol. Sci., 11, 150 (1990)、Physiol. Rev., 75, 725 (1995)、Arch. Biochem. Biophys., 322, 1 (1995)、Endocrinol. Rev., 16, 370 (1995)、Kidney International, 55, 29 (1999)、Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, John Wiley & Sons, New York (1990)、及びPhosphodiesterase Inhibitors, Academic Press, New York (1996)〕。PDEスーパーファミリーは現在までに生化学的特性、酵素学的特性、さらには対応するcDNAのクローン化によるアミノ酸配列の比較等により、以下の10種類のファミリー(PDE1~PDE10)に分類されている〔Kidney International, 55, 29 (1999)、J. Biol. Chem., 274, 18438 (1999)、Gene, 234, 109 (1999)、及びProc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 7071 (1999)〕。

1. Ca^{2+} /カルモジュリン依存性PDE (PDE1)
 2. cGMPで刺激されるPDE (PDE2)
 3. cGMPで阻害されるPDE (PDE3)
 4. cAMP特異的PDE (PDE4)
 5. cGMP特異的PDE (PDE5)
 6. cGMP特異的フォトレセプターPDE (PDE6)
 7. 高親和性、cAMP特異的PDE (PDE7)
 8. 高親和性、cAMP特異的PDE (PDE8)
 9. cGMP特異的PDE (PDE9)
 10. cAMP PDE、cAMPで阻害されるcGMP PDE (PDE10)
- 多くのファミリーは、異なる遺伝子によりコードされるサブタイプおよびそれらのスプライスバリエント(アイソフォーム)からなる〔Kidney International, 55, 29 (1999)、Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, John Wiley & Sons, New York (1990)、及びBiochem. Biophys. Res. Commun., 261, 551 (1999)〕。いくつかのPDEアイソフォームについては組織および細胞特異的な発現が報告されている〔Trend. Pharmacol. Sci., 22, 217

(1997)、*Physiol. Rev.*, 75, 725 (1995)、及び*Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 1 (1995))。現在までに、30種以上のPDE分子種が報告されているが、さらなる未知のPDEの存在が想定されている。

PDEは通常3つの機能ドメインからなる構造を有している〔*Trend. Pharmacol. Sci.*, 22, 217 (1997)、*Physiol. Rev.*, 75, 725 (1995)、*Arch. Biochem. Biophys.*, 322, 1 (1995)、及び*Endocrinol. Rev.*, 16, 370 (1995))。中央からC末端側にかけて存在する約270アミノ酸よりなる領域(catalytic core domain)はすべての脊椎動物由来PDEで保存されており、触媒ドメインを構成する。この領域は個々のPDEファミリー内の遺伝子間でよく保存されており、アミノ酸配列で80%以上の一致が認められる。また、異なるPDE遺伝子ファミリー間ではアミノ酸配列で25%~40%程度一致している。catalytic core domainには2つの Zn^{2+} 結合モチーフが存在している〔*J. Biol. Chem.*, 269, 22477 (1994))が、PDE3ファミリーのcatalytic core domainには、他のPDEファミリーには存在しない44アミノ酸の挿入があるために最初の Zn^{2+} 結合モチーフが破壊されている。全てのPDEの触媒ドメインにHDXHXHXXXN (アミノ酸残基は一文字表記で示す。H; ヒスチジン、D; アスパラギン酸、N; アスパラギン、X; 任意のアミノ酸残基)の保存されたモチーフが見出されている。

PDE4のcatalytic core domainを含む領域は大腸菌で発現され、PDE活性を有していることが示された〔*J. Biol. Chem.*, 267, 18929(1992))。保存されている触媒ドメインにはPDEファミリー特異的な基質親和性や阻害剤に対する感受性を規定する配列が含まれている〔*J. Biol. Chem.*, 274, 4839 (1999))。

触媒ドメインがよく保存されているのに対してN末端側の制御ドメインはPDEサブタイプ、アイソフォーム間で構造および大きさが異なっている〔*Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action*, John Wiley & Sons, New York (1990))。このドメインには、リガンド結合部位、リン酸化部位、膜結合部位、蛋白-蛋白相互作用に關与する配列等が含まれている。

相対的に小さいC末端ドメインの機能的な重要性については十分には明らかに

されていない。PDE4B2Bアイソフォームの487番目のセリン残基が mitogen-activated protein kinaseによりリン酸化を受けることが報告されている [Biochem. J., 316, 751 (1996)]。

PDEサブタイプあるいはアイソフォーム特異的なアゴニストあるいはアンタゴニストは、細胞内環状ヌクレオチド量の変動が関与している多種類の疾患に対して、予防的あるいは治療的な効果が期待される。例えば免疫および炎症応答に関する多くの機能は細胞内cAMPを増加させる薬剤により阻害される [Mol. Pharmacol., 47, 1164 (1995)]。一方、cGMPは、平滑筋、肺および脳細胞の機能に関与している [Pharmac. Ther., 51, 13 (1991)]。非特異的PDE阻害剤、さらにはPDEサブタイプに選択性を示す阻害剤が合成され、それらのうちいくつかについては治療薬としての可能性が実験的あるいは臨床的に検討されている [Trends Pharmacol. Sci., 22, 217 (1997)、Physiol., Rev., 75, 725 (1995)、Phosphodiesterase Inhibitors, Academic Press, New York (1996)]。例えば、PDE3阻害剤は、抗血栓剤、降圧剤およびうつ血性心不全治療に有用な強心剤として開発されている。最近、PDE3Bがレプチンのインスリン分泌阻害に関与していることが報告された [J. Clin. Invest., 102, 869 (1998)]。PDE4阻害剤としては、rolipramが鬱病治療薬として用いられている。TNF- α はin vitroでHIV-1の複製を促進することが報告されている。rolipramは lipopolysaccharide刺激によるTNF- α 産生を抑制することから、HIV-1複製を阻害する可能性が指摘されている [AIDS, 9, 1137 (1995)]。また、TNF- α 、インターフェロン γ などのサイトカイン産生を抑制する活性を有していることから、脳脊髄炎(encephalomyelitis)、多発性硬化症(MS)、遅発性運動異常(tardive dyskinesia)などに対する効果も期待されている。PDE4阻害剤は、抗炎症作用を有することからリウマチなどの治療薬として、また抗炎症作用のみならず気管支拡張作用も有することから喘息の治療薬として、その可能性が評価されている [Clin. Exp. Immunol., 100, 126 (1995)、Am. J. Respir. Crit. Care Med., 157, 351 (1998)]。PDEは多くの細胞の増殖に関与しており、悪性腫瘍の治療薬の

ターゲットとしても興味を持たれている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5330 (1994)〕。また、ラットメサングウム細胞を用いた系で、P D E 3 阻害剤がメサングウム細胞の分裂抑制作用を有すること〔J. Clin. Invest., 96, 401 (1995)〕、P D E 4 阻害剤が活性酸素代謝産物(reactive oxygen metabolite)の産生を抑制することが報告されている〔J. Biol. Chem., 272, 9854 (1997)〕。さらに、抗Thy-1腎炎ラットでP D E 阻害剤が蛋白尿の進展を抑制することが示された〔J. Clin. Invest., 98, 262 (1996)〕。

糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍などのような環状ヌクレオチドを介したシグナル伝達の異常が発症および病態の進展に関与している可能性のある疾患を予防あるいは治療するために、その疾患に関与するP D E サブタイプ、さらにはアイソフォーム選択的なアゴニスト、アンタゴニストの開発が求められている。非特異的な薬剤は目的とする組織および細胞以外の組織、細胞におけるc A M P あるいはc G M P を介するシグナル伝達系への影響が問題になるのであまり望ましくない。

P D E の場合、酵素の存在量が極微量であること、基本的に同様の反応を触媒しており、基質特異性が重複していることなどから組織あるいは細胞からのアイソフォームの精製及び単離は容易ではない。古典的な酵素学的手法を用いた新規なアイソフォームの単離は、現在用いられている精製法の限界および単一の精製酵素標品が得られたことを確認することの困難さにより阻まれている。他のアプローチとして、アイソフォーム選択的なアッセイ条件を用いることや、免疫学的な手法を用いたサブタイプやアイソフォームの分離及び同定が行われてきた。これらのアプローチには、サブタイプやアイソフォームを同定するために必要な判定基準の確立が必要であり、時間と労力を要するばかりでなく、技術的に困難な場合もある。結果として、多くの研究は、複数のサブタイプあるいはアイソフォームを含む部分精製P D E 標品を用いて行われてきた。

組織あるいは細胞特異的な新規P D E アイソフォームを組換えDNA技術を用

いて大量に調製することができれば、これらの困難を克服でき、より特異的かつ安全なアゴニストおよびアンタゴニスト開発が可能になることが期待される。

発明の開示

本発明は、新規PDEポリペプチド及び該PDEポリペプチドをコードするDNAを提供することを目的とする。本発明はまた、該PDEポリペプチド又は該ポリペプチドを認識する抗体などを利用して、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、脾炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の予防及び／又は治療のための医薬を提供することを目的とする。

本発明者らは、HepG2細胞からcDNAライブラリーを調製しランダムに塩基配列の解析を行った。ヒトPDE10A (GenBank:AB020593) の遺伝子配列情報を基に、このようにして取得したヒトcDNA配列に対して、BLASTサーチ相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、ヒトPDE10AおよびヒトPDE5Aの触媒部位と相同性の認められる部分配列を見出した。これらの配列を解析し、ポリペプチドを発現させてPDE活性を検出することにより、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の(1)～(33)の発明に関する。

- (1) 配列番号1または配列番号15に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド。
- (2) (1)に記載のポリペプチドをコードするDNA。
- (3) 配列番号2または配列番号16に記載の塩基配列を有するDNA。
- (4) (2)または(3)に記載のDNAを含む組換えベクター。
- (5) (4)に記載の組換えベクターを保有する形質転換体。
- (6) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から成る群から選ばれる形質転換体である、(5)に記載の形質転換体。
- (7) 微生物がEscherichia属に属する微生物である、(6)に記載の形質転換体。

(8) 受託番号 F E R M B P - 6 9 7 6 を有する、(7)に記載の形質転換体。

(9) (5) ~ (8) のいずれかに記載の形質転換体を培地で培養し、培養物中に(1)に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドの製造方法。

(10) (2) または (3) に記載の DNA の塩基配列中の連続した 5 ~ 6 0 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。

(11) オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3' - P 5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C - 5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C - 5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA 中のリボースが 2' - O - プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが 2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、(10)に記載のオリゴヌクレオチド。

(12) (10) または (11) に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1)に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

- (13) (10) または (11) に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、(1) に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。
- (14) (1) に記載のポリペプチドを認識する抗体。
- (15) (14) に記載の抗体を用いることを特徴とする、(1) に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。
- (16) (14) に記載の抗体を用いることを特徴とする、(1) に記載のポリペプチドの免疫組織染色法。
- (17) (14) に記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。
- (18) (1) に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホジエステラーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。
- (19) (18) に記載の方法により得られる化合物。
- (20) (1) に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。
- (21) (12) に記載の方法を用いて (1) に記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、(20) に記載のスクリーニング方法。
- (22) (15) に記載の方法を用いて (1) に記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、(20) に記載のスクリーニング方法。
- (23) (20) ~ (22) のいずれかに記載の方法により得られる化合物。
- (24) (1) に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御するプロモーター DNA。
- (25) (24) に記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを

特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。

(26) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から成る群から選ばれる遺伝子である、(25)に記載のスクリーニング方法。

(27) (25)または(26)に記載の方法により得られる化合物。

(28) (1)に記載のポリペプチドを含有する、医薬。

(29) (10)または(11)に記載のオリゴヌクレオチドを含有する、医薬。

(30) (14)に記載の抗体を含有する、医薬。

(31) (19)、(23)または(27)に記載の化合物を含有する、医薬。

(32) 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の予防または治療のための医薬である、(28)から(31)の何れかに記載の医薬。

(33) 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の診断のための医薬である、(28)から(31)の何れかに記載の医薬。

図面の簡単な説明

図1は、新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段：アミノ酸番号を数字+’で記載)と、ヒトPDE5A (GenBank : CAA06170) のアミノ酸配列(下段：アミノ酸番号を数字+”で記載)との比較を示した図である。アスタリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で

示す。)下線はHDXXHXXXXNモチーフを示す。

図2は、新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段:アミノ酸番号を数字+’で記載)と、ヒトPDE10A(GenBank: BAA78034)のアミノ酸配列(下段:アミノ酸番号を数字+”で記載)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はHDXXHXXXXNモチーフを示す。

図3は、プラスミドp200-EBの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

図4は、新規ヒトPDEホモログcDNAの一部の配列(約0.2kb)をプローブとしてヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター[Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)]およびヒト心臓、脳、肝臓、脾臓、胎盤、肺のpoly(A)⁺ RNAフィルター[Human Normal Tissue mRNA blot I (Normalized)のフィルター(東洋紡社製)]に対してノーザンハイブリダイゼーションを行なった結果を示す図である。

図5は、プラスミドpGST-PDEの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

図6は、発現大腸菌可溶性画分におけるPDE活性測定の結果を示す。GSTはベクターのみを導入した大腸菌、GST-PDEはGST-PDE融合蛋白発現大腸菌を示す。

図7は、プラスミドp23-2kおよびp23-1kの構築過程および制限酵素地図を示した図である。

図8は、新規ヒトPDEのアミノ酸配列(上段)と、ヒトPDE5A (GenBank: CAA06170)のアミノ酸配列(下段)との比較を示した図である。アステリスクは一致しているアミノ酸残基、ピリオドは相同性のあるアミノ酸残基を示す。(アミノ酸残基は一文字表記で示す。)下線はHDXXHXXXXNモチーフを示す。

図9は、新規ヒトPDEホモログcDNAの配列情報を基にPCRプライマーを設計し、ヒト脾臓、肺、乳腺、前立腺、骨格筋、精巣各組織のmRNAより調製したcDNAを鋳型にPCRを行なった。増幅産物をアガロース電気泳動した結果を示す。

上記図において、kbはキロ塩基対 (kilobase pairs)を示し、Apはアンピシリン耐性遺伝子を示し、T7はT7プロモーターを示し、GSTはグルタチオンSトランス

フェラーゼを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のポリペプチドは、下記の何れかのアミノ酸配列から成ることを特徴とする。

(A) 配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列：又は

(B) 配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするアミノ酸配列。

配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつホスホジエステラーゼ (P D E) 活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング 第 2 版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、国際公開W085/00817号、及びNature, 316, 601 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1 または配列番号 15 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1 個から数十個、好ましくは 1~20 個、より好ましくは 1~10 個、さらに好ましくは 1~5 個である。

また、本発明のポリペプチドがホスホジエステラーゼ活性を有するためには、配列番号 1 または 15 に記載のアミノ酸配列との相同性が BLAST [J.Mol.Biol., 215, 403(1990)] や FASTA [Methods in Enzymology, 183, 63 (1990)] 等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 60% 以上、好ましくは 70% 以上、より好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、特に好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% 以上であることが好ましい。

ただし、本発明のポリペプチドには、公知のポリペプチドは含まれない。

本発明はまた、上記した本発明のポリペプチドをコードする DNA を提供するものである。本発明のポリペプチドをコードする DNA の具体例として、下記の何れかの塩基配列を有する DNA が挙げられる。

(A) 配列番号 2 または配列番号 16 に記載の塩基配列：

(B) 上記 (A) に記載の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつホスホジエステラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列」とは、配列番号 2 または配列番号 16 に記載の塩基配列を有する DNA をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/L}$ の NaCl 存在下、 65°C でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2$ 倍濃度の SSC (saline-sodium citrate) 溶液 (1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、 150 mmol/L 塩化ナトリウム、 15 mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる) を用い、 65°C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques,

A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST (J.Mol.Biol., 215, 403, 1990) やFASTA (Methods in Enzymology, 183, 63-69) 等の解析ソフトを用いて計算したときに、配列番号2または配列番号16で表される塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性を有するDNAを挙げることができる。

ただし、本発明のDNAには、公知のDNAは含まれない。

以下、本発明の実施方法および利用方法について詳細に説明する。

[1] 本発明のDNAの取得およびオリゴヌクレオチドの調製

ヒトPDE10A (GenBank: AB020593) のアミノ酸配列と相同性をもつ遺伝子を、遺伝子データベース、蛋白質データベースより、Blast、Smith-Waterman法等を利用したプログラムあるいはフレームサーチ〔イスラエル、コンピュジェン (Compugen) 社製〕相同性検索ソフトウェアを利用して検索する。

データベースとしてはGenBank、Swiss-Plot等の公的なデータベースを利用することができる。

また私的に持っているcDNAライブラリー中のクローンのcDNAを、ランダムかつ大規模に塩基配列決定し、得られた配列データを集積し、作製した私的なデータベースを利用することもできる。

得られた、ヒトPDE10A (GenBank: AB020593) と相同性をもつ遺伝子が、EST (Expressed Sequence Tag) のように、遺伝子の一部の塩基配列のみである場合は、以下のようにしてそのcDNAの全長を得ることができ、該cDNAより本発明のDNAを取得することができる。

本発明のDNAの起源が特に制限されることはないが、好ましくは哺乳動物であり、特に好ましくはヒトである。

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNA

あるいはmRNAを調製する。

全RNAを調製する方法として、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、及び実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

全RNAからポリ (A) ⁺ RNAとしてmRNAを調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) やオリゴdTラテックスを用いる方法等を用いることができる。

ファースト・トラック・mRNA単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接mRNAを調製することもできる。

適切な細胞または組織として、データベースから見出されたEST等が含まれていたcDNAライブラリーの種類を調べ、該ライブラリーを構築するために用いた細胞または組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全RNAあるいはmRNAを用い、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法として、モレキュラー クローニング 第2版やカレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

cDNAライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸

菌K 1 2株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、p c D 2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、p U C 1 8〔Gene, 33, 103 (1985)〕、p A M o〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕等を挙げることができる。

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、Escherichia coli K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、Escherichia coli JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版)等を用いることができる。

上記方法により作製したcDNAライブラリーに加え、市販のcDNAライブラリーも利用することができる。

市販のcDNAライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器cDNAライブラリーをあげることができる。

(2) 本発明のDNAの取得

上記(1)で作製したcDNAライブラリーより、本発明のDNA又はその一部を含有するcDNAクローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブ

を用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブランク・ハイブリダイゼーション法〔モレキュラー クローニング 第2版〕等により選択することができる。

プローブとしては、一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーを用いて、PCR〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕を利用した方法でcDNAの一部を増幅した断片や、一部明らかになっている塩基配列に基づいたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

プライマーとして、全長cDNAの5'末端側および3'末端側の両方の塩基配列がEST等により明らかになっている場合には、その塩基配列に基づいて調製したプライマーを用いることができる。

該cDNAの両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかになっている塩基配列に基づいたプライマーでPCRを行う5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)および3'-RACE〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)〕により、プライマーに用いた配列よりも5'末端側および3'末端側のcDNA断片を得ることができる。

得られたcDNA断片を連結することにより、本発明の全長DNAを取得することができる。

また、上記cDNAライブラリーから取得されたcDNAが完全長のポリペプチドをコードしていない場合は、以下のようにして完全長のポリペプチドをコードするcDNAを得ることもできる。

各種臓器または各種細胞から調製した一本鎖cDNAライブラリーまたは上記記載の方法で作製できるcDNAライブラリーを鋳型にして、該cDNAに特異的なプライマーセットを用いてPCRを行うことにより、該cDNAに対応する遺伝子を発現する臓器や細胞を特定し、特定された臓器あるいは細胞由来のcDNAライブラリーに対し、該cDNAをプローブにしてコロニーハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより改めて該cDNAの全長を含むcDNAをcDNAライブラリーから選択することができる。

各種臓器または各種細胞由来の一本鎖cDNAライブラリーは、常法または市販されているキットに従って作製することができるが、例えば以下に示す方法で作製できる。

各種臓器または各種細胞からグアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法 [Anal. Biochem., 162, 156 (1987)] により全RNAを抽出する。必要に応じて、全RNAをデオキシリボヌクレアーゼ I (Life Technologies社製) で処理し、混入の可能性がある染色体DNAを分解する。得られた全RNA各々について、オリゴ (dT) プライマーまたはランダムプライマーを用いて SUPERSCRIPTM Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社製) により、一本鎖cDNAライブラリーを作製できる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer : 373A・DNAシーケンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

上記方法により取得された本発明のDNAおよびその一部を含むプラスミドとして、例えば、配列番号2で表される塩基配列からなるDNAの一部を有するプラスミドhep10314、および配列番号16で表される塩基配列からなるDNAの一部を有するプラスミドp23-1k、p23-2kをあげることができる。

プラスミドhep10314を含有する大腸菌 Escherichia coli JM109/hep10314は、FERM BP-6976として、平成11年12月22日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566) に寄託されている。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒトおよびマウス由来の目的とするDNAを取得することができる。

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、ホスホアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJ等の塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。

新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ (FrameSearch) 等の相同性検索プログラムを用いて、GenPept、PIR、Swiss-Prot等のアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAまたはDNA断片を用いて、常法あるいは上記のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または配列番号16で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度 (T_m) および塩基数が極端に変わることはない上記のオリゴヌクレオチドが好ましい。

該オリゴヌクレオチドとして、例えば、配列番号10、11、17または18で表されるオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体 (本明細書中では、オリゴヌクレオ

チド誘導体とも言う)も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

〔2〕本発明のポリペプチドの調製

(1) 形質転換体の作製

上記〔1〕に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、本発明のポリペプチドを製造するために、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコル・イン・モレキュラ・バイオロジー等に記載された方法を用いることができる。

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、微生物（細菌、酵母等）、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA及び転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（ファルマシア社）、pSE280（インビトロジェン社）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社〕、pQE-8（キアゲン(QIAGEN)社）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK (-)（ストラタジーン社）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM BP-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735）、pGEX（ファルマシア社）、pET-3（ノバジェン社）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus（Invitrogen社）、pMAL-c2（New England Biolabs社）等を挙げることができる。

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、P_Iプロモーター、P_Bプロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp x 2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let I

プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の DNA の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniageneses、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法〔Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)〕等を挙げることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用

いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを
用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、
ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックボ
リペプチドプロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモ
ーターを挙げるることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベ
ロミセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげる
ことができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe
、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、
Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい
ずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in
Enzymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163
(1983)]等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D
NA I/Amp (インビトロジェン社製)、p c DNA I、p CDM 8 [Nature,
329, 840 (1987)]、p AGE 107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133
(1990)]、p REP 4 (インビトロジェン社製)、p AGE 103 [Journal of
Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、p AMo、p AMoA、p AS 3-3 (特
開平2-227075)等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いる
ことができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺
伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロ
モーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR
 α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサ

一をプロモーターと共に用いてもよい。

動物細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ(Namalwa)細胞またはNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151 (1988)〕、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としては、BALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー・ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4 (インビトロジェン社製) 等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、適切な本発明のポリペプチドを発現させるための発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

(2) 形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の

方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモ

クターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地〔ファーマミンジェン (Pharmingen) 社製〕、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell400、ExCell405〔いずれもJRHバイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まない溶液あるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドあるいはその糖鎖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)]、特開平

05-336963、W094/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、本発明のポリペプチドをFlagペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗Flag抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes & Dev., 4, 1288 (1990)〕。更に、該ポリペプチドに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

更に、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。

また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Synthecell-Vega）社、パーセプティブ（PerSeptive）社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

〔3〕 本発明のポリペプチドを認識する抗体の調製

（1）ポリクローナル抗体の調製

上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物1匹当たり50～100 μ gが好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン(keyhole limpet haemocyanin)や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに3～10回行う。各投与後、3～7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法)：医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、該血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、またはDEAEセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはGーカラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(2) モノクローナル抗体の調製

(2-1) 抗体産生細胞の調製

上記(1)において、免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリスー塩化アンモニウム緩衝液(pH 7.65)で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた

脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(2-2) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株

P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]

、P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)

[Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mmol/L)、

2-メルカプトエタノール ($5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)、ジェンタマイシン ($10 \mu\text{g/mL}$) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた

培地 (以下、正常培地という) に、さらに8-アザグアニン ($15 \mu\text{g/mL}$)

を加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合

には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(2-3) ハイブリドーマの作製

(2-1) で取得した抗体産生細胞と(2-2) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83 g 、リン酸一カリウム 0.21 g 、食塩 7.65 g 、蒸留水 1 L 、pH 7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = $5 \sim 10 : 1$ になるよう混合し、 $1,200 \text{ rpm}$ で5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、 37°C で、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2 g 、MEM 2 mL およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 mL を混合した溶液を $0.2 \sim 1 \text{ mL}$ 添加し、更に1~2分間毎にMEM培地 $1 \sim 2 \text{ mL}$ を数回添加する。

添加後、MEM培地を加えて全量が 50 mL になるように調製する。

該調製液を 900 rpm で5分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン (10^{-4}mol/L)、チミジン ($1.5 \times 10^{-5}\text{mol/L}$) およびアミノプテリン ($4 \times 10^{-7}\text{mol/L}$) を加えた培地〕100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100 μL /穴ずつ分注し、5% CO_2 インキュベーター中、37 $^{\circ}\text{C}$ で7～14日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディイズ〔Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter14 (1988)〕等に述べられている酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの全長または部分断片精製標品を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(2-4)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

(2-4)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane)-0.5mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(2-3)で取得した本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射

する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナル抗体で用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

[4] 本発明のポリペプチドのPDE活性の測定

[2]に記載の方法により、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を宿主として、本発明のポリペプチドを発現させたもの、あるいは、アフリカツメガエル卵母細胞にDNAあるいはin vitroで調製したcRNAを用いてマイクロインジェクション法 [Methods in Enzymology, 207, 225 (1992), Methods in Enzymology, 254, 458 (1995)] により発現させたもの、in vitro翻訳産物等をPDE活性の測定に用いる。PDE活性は検出可能な試薬 (例えば、放射性試薬、蛍光試薬または比色試薬) で標識された環状ヌクレオチド (例えば、 $[^3\text{H}]$ cAMPあるいは $[^3\text{H}]$ cGMP) の3'-ホスホエステル結合を加水分解して生成するヌクレオシド5'-モノホスフェート (例えば、 $[^3\text{H}]$ 5' AMPあるいは $[^3\text{H}]$ 5' GMP) の分離、定量、あるいはさらに、5'ヌクレオチダーゼ処理した後、生成物を分離、定量することにより測定する [J. Biol. Chem., 257, 1973 (1982), Methods in Enzymology, 159, 457 (1988)]。また、内在性の2つのPDE (pde 1、pde 2) を欠損した酵母 [例えば、Saccharomyces cerevisiae strain PP5 (ATCC number 96135)、Saccharomyces cerevisiae strain 10DAB (ATCC number 74049)] 中で本発明のポリペプチドを発現させ、熱ショック感受性、窒素欠乏に対する感受性などの回復を指標にPDE活性を検出することもできる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11970 (1993), J. Biol. Chem., 274, 4839 (1999)]。

[5] 本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの探索・同定お

よび治療薬としての利用

上記〔４〕の活性測定に用いることのできる細胞、あるいは、後述〔７〕の方法で本発明のポリペプチドあるいはmRNAを発現していることの確認された組織、細胞等を用い、被験試料を添加し、上記〔４〕記載の方法で、PDE活性を測定する。

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのPDE活性の比較、あるいは、本発明のポリペプチドを発現させた内在性PDE欠損酵母を用いたバイオアッセイにより、被験試料の中からPDE活性を増強する物質（アゴニスト）および阻害する物質（アンタゴニスト）をスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をあげることができる。

上記の方法により取得される、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、治療薬として単独で用いることが可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として用いることが望ましい。

該治療薬の投与方法としては、治療に際し最も効果的な方法を使用することが望ましく、経口投与または、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与による方法を用いることができる。

該治療薬の剤形としては、軟膏剤、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、テープ剤等をあげることができる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等をあげることができる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造することができる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用い製造することができる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、例えば、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製することができる。

座剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製することができる。

噴霧剤は、上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニストをそのまま噴霧剤として用いることが可能であるが、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製した噴霧剤が好ましい。

担体として、具体的には乳糖、グリセリン等を例示することができる。

上記で取得されたアゴニストまたはアンタゴニスト、および担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤を調製することが可能である。

これらの非経口剤においても、経口剤で添加剤として例示した成分を添加することができる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg} \sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

[6]本発明のポリペプチドの発現を調節する化合物（以下、発現調節化合物と略す）の探索および同定

(1)本発明の抗体を用いた発現調節化合物の探索および同定

本発明のポリペプチドを発現する細胞を被験試料と接触させた後、本発明の抗体を用いることにより、本発明のポリペプチドの発現調節化合物を探索、同定することができる。

細胞としては、本発明のポリペプチドを発現している細胞、細胞株、組織ならいかなるものでも用いることができる。

例えば、下記[7]に記載した抗体により免疫学的に検出する方法あるいはmRNAを検出する方法を用い、該ポリペプチドの発現が認められた細胞、細胞株あるいは組織を用いることができる。

好適な細胞株として、例えば、HepG2細胞をあげることができる。

被験試料としては上記[5]の被験試料であげたものを用いることができる。

本発明のポリペプチドを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞と接触させた後、本発明の抗体を用い、該細胞の発現したポリペプチド含量を定量する。定量する方法としては、例えば下記の免疫細胞染色を利用した方法をあげることができる。

培養付着細胞をPBS緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン、0.02%EDTA(エチレンジアミン4酢酸)を含むPBS緩衝液3mLを加え、余分な溶液を除いた後、37℃、5分間インキュベートすることによりフラスコより細胞を剥がす。

浮遊細胞については培養細胞をそのまま用いることができる。該細胞をPBS緩衝液で洗浄後、固定液に懸濁する。固定液としては例えば3.7%ホルムアルデヒドを含むPBS緩衝液を挙げることができる。室温にて30分インキュベート後、PBS緩衝液で洗浄し膜透過性反応液に懸濁する。膜透過性反応液としては例えば0.1%Triton X-100を含むPBS緩衝液を挙げることができる。

該処理を行った細胞を免疫細胞染色用緩衝液（1% BSA、0.02% EDTA、0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS）等に懸濁し、 $1 \sim 20 \times 10^6$ 個ずつ丸底96穴プレートに分注する。

該プレートに、本発明のモノクローナル抗体を分注する。

モノクローナル抗体としては、[3](2-3)で取得した本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養上清、[3](2-4)で取得した精製モノクローナル抗体をあげることができる。更に、該モノクローナル抗体を標識した抗体も用いることができる。

モノクローナル抗体を標識した抗体としては、例えばビオチン標識した抗体をあげることができる。

ビオチン標識した抗体は公知の方法（酵素抗体法：学際企画刊1985年）で調製することができる。

上記抗体を、免疫細胞染色用緩衝液あるいは10%動物血清を含む免疫細胞染色用緩衝液を用いて $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように希釈する。

該希釈抗体を $20 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ となるように分注し、氷冷下で30分間放置する。

標識されていない抗体を用いた場合には、上記プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞を洗浄する。FITC (fluorescein isothiocyanate) あるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識した抗マウスイムノグロブリン抗体あるいは抗ラットイムノグロブリン抗体を $0.1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 程度の濃度で含む免疫細胞染色用緩衝液を $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

ビオチン標識した該モノクローナル抗体を用いた場合には、上記プレートにFITCあるいはフィコエリスリン等の蛍光色素で標識したストレプトアビジンを $50 \sim 500 \mu\text{L}/\text{穴}$ ほど分注し、氷冷下で30分間遮光して放置する。

両ケースとも、放置後、プレートに免疫細胞染色用緩衝液を添加し、細胞をよく洗浄し、蛍光顕微鏡、セルソーター等により解析する。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(2) 本発明のポリペプチド遺伝子の転写産物定量系を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を被験試料と接触させた後、該mRNA含量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAを発現する細胞としては、例えば上記[6](1)記載の細胞株を、被験試料としては上記[5]のものをを用いることができる。

本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドをコードするmRNAを発現する細胞を、該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞が発現した該mRNAの含量を、通常のノーザンハイブリダイゼーション法、RNAのドットプロットハイブリダイゼーション法、RT-PCR法等を用い定量する。

ハイブリダイゼーション法等に用いることのできるプローブおよびRT-PCR法等に用いることのできるプライマーとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子断片をあげることができる。

具体的には、配列番号2または配列番号16に記載の塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを好適に用いることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、本発明のポリペプチドをコードするmRNA含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

(3) レポーター遺伝子を用いた探索および同定

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御する領域（以下、転写制御領域と略す）の下流にレポーター遺伝子の連結されたDNAを含むプラスミ

ドで形質転換された形質転換体と被験試料とを接触させた後、レポーター遺伝子によりコードされたポリペプチドの発現量を定量することにより発現調節化合物を探索、同定することができる。

転写制御領域は、通常、遺伝子の5'上流に含まれることが多い。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の5'上流領域は、例えばGenome Walker kits (Clontech社製)等を用いて調製することができる。また、該領域を適当な制限酵素を用い、適切な長さに切断した断片を転写制御領域として用いることができる。

レポーター遺伝子としては、該遺伝子の翻訳産物が細胞内で安定であり、該翻訳産物の存在量が容易に定量できるものであればいかなるものでも用いることができ、該遺伝子がコードするポリペプチドとして、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、 β -ガラクトシダーゼ(β -gal)、ルシフェラーゼ(luc)、 β -グルクロニダーゼ、エクオリン、グリーンフルオレッセントプロテイン(GFP)等をあげることができる。

該転写制御領域を含むレポータープラスミドを導入する宿主細胞としては、いかなる細胞も用いることができるが、好適には、[6](1)記載の本発明のポリペプチドあるいは該ポリペプチドmRNAの発現が認められている細胞株を用いることができる。

被験試料として、上記[5]のものを用いることができる。

転写制御領域の下流に常法によりレポーター遺伝子を連結し、作製したプラスミドを用い、常法により宿主細胞を形質転換する。

また、ポジティブセレクション用マーカー(G418耐性遺伝子等)およびネガティブセレクション用マーカー(単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼやジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子等)をつないだジーンターゲティングベクターを作製し、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子の一部をレポーター遺伝子で置換した細胞株を作製することもできる[Nature, 336, 348 (1988)、Analytical Biochemistry, 214, 77 (1993)、Gene Targeting, The Practical Approach Series, IRL Press (1993)]。

該形質転換体を、例えば該細胞の増殖することのできる培地に懸濁し、被験試料を該培地に添加し、該細胞を接触させた後、該細胞の発現したレポーター遺伝子にコードされたポリペプチドの量を、該ポリペプチドに適した方法で検出、定量する。

検出、定量法として、CATの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、60頁に記載の方法を、 β -galの場合には、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、16章、66頁に記載の方法を、lucの場合には、例えば、実験医学別冊バイオマニュアルシリーズ4 遺伝子導入と発現・解析法、89(1994)に記載の方法を、GFPの場合には、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653 (1997)記載の方法等をあげることができる。

被験試料を添加しない系と比較し、レポーター遺伝子にコードされたポリペプチド含量を増加あるいは減少させる被験試料を探索することにより、発現調節化合物を同定することができる。

[7] 本発明のDNA、ポリペプチド、抗体、アゴニスト、アンタゴニストおよび発現調節化合物の利用

(1) 本発明のDNAは、該DNAをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から1と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

(2) 本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織や細胞から1と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR (reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990))を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの検出や定量を行うことができる。

該mRNAを定量する方法は、本遺伝子が関与する病態の診断に用いることが

できる。

各種病態モデル動物において、該mRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該mRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(3) 本発明のオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトおよびマウスなど非ヒト哺乳動物の組織切片に対してin situハイブリダイゼーション〔Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)〕を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかに関する情報および細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかに関する情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するために有用である。

(4) 本発明のDNAをプローブとして用い、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション〔モレキュラー クローニング 第2版〕を行うことにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異を検出することができる。

変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆または悪性腫瘍等の疾患の診断を行うことができる。

(5) 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子をPCR等を用いて増幅して塩基配列を解析することにより、あるいはDNAチップ等を用いて解析を行うことにより、1塩基多型(single nucleotide polymorphisms ; SNP)などの多型を検出することができる。多型の検出を行うことにより、該遺伝子の多型が関連している可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆または悪性腫瘍等の疾患の診断を行うことができる。

(6) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA、DNAまたはその誘導体)を用い、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学, 46, 681 (1991)、Bio/Technology, 9, 358 (1992)〕、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の予防や治療に用いることができる。

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列中の連続した5～60塩基と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳開始領域にある5～60塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(7) 本発明のDNAを用い、〔2〕記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療薬または予防薬が考えられる。

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(8) 本発明のオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウィルス、

アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

(9) 本発明のポリペプチドを抗原として用い、[3]記載の方法により本発明のポリペプチドに対する抗体を製造することができる。

本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて、本発明のポリペプチドを免疫学的に検出または定量することができる。

具体的には、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、酵素標識抗体法や蛍光抗体法による免疫組織染色、ウェスタンブロット法等を用いた検出法をあげることができる。

具体的には、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうち認識するエピトープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、¹²⁵I等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体を用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

また、本発明の抗体は病理組織切片を用いた免疫組織染色にも利用できる。本発明の抗体を用い、健常者および被験者の細胞または組織に存在する本発明

のポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、その量を健常者と被験者とで比較し、発現量が変化しているかどうかを調べることにより、被験者の糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の病態の診断に用いることができる。

また、本発明の抗体を用いて、各種病態モデル動物の組織および細胞に存在する該ポリペプチドを免疫学的に検出または定量し、正常動物と比較することにより、病態における該ポリペプチドの重要性を明らかにすることができる。さらに、薬剤の有無による該ポリペプチドの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(10) 本発明のポリペプチドの機能(PDE活性)を阻害する抗体を投与することにより、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、膵炎、潰瘍、アレルギー、

喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療または予防が期待される。

本発明の抗体を含有する医薬は、上記〔5〕の本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの医薬製剤の調製法と同様な方法を用いて調製することができ、調製された該医薬製剤を上記〔5〕の場合と同様の方法で投与することができる。

(11) 本発明のアゴニスト、アンタゴニストおよび本発明のポリペプチド遺伝子の発現を調節する化合物は、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍等の疾患の治療または予防に用いることが期待される。

本出願が主張する優先権の基礎となる2000年3月7日出願の特願2000-61464及び2000年7月10日出願の特願2000-208610に記載されている内容は全て本明細書中に開示として引用するものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に例示するが、本発明の範囲は実施例によって限定されることはない。

実施例

実施例1：PDE活性を有する蛋白質をコードするヒトcDNA断片のクローン化

(1) HepG2細胞由来cDNAライブラリーの作製

ヒト肝細胞株HepG2から、文献(J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)に記載されているCytoplasmic RNA抽出法およびPolyA(+)RNA精製法に準じmRNAを抽出し、精製した。それぞれのpolyA(+)RNAよりオリゴキャップ法(K. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138, 171 (1994))によりcDNAライブラリーを作製した。Oligo-cap linker (配列番号3) およびOligo dT primer (配列番号4) を用いて、文献〔鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41, 603 (1996)、 Y. Suzuki et al., Gene,

200, 149 (1997)) に従ってBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖 cDNA の合成とRNAの除去を行った。次いで、5'末端側と3'末側のPCRプライマー (配列番号 5 および 6) を用いたPCR(polymerase chain reaction)により2本鎖 cDNA に変換した後、制限酵素SfiIで切断した。該 cDNA をDraIIIで切断したベクター pME18SFL3 (GenBank AB009864, Expression vector, 3392 bp) に組み込み、cDNA ライブラリーを作製した。cDNA は発現が可能な方向に組み込んだ。

(2) ランダムシーケンス

上記 (1) で調製した cDNA ライブラリーの各大腸菌クローンから常法に従ってプラスミドDNAを取得し、各プラスミドが含有する cDNA の5'末端の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、キット (BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製) とDNAシーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems社製) を用いて行った。プライマーとしては、配列番号 7 および 8 に示す合成DNAを使用した。

(3) N末領域のクローン化と相同性検索ソフトウェアを用いた解析

得られた塩基配列についてはヒトPDE10A (GenBank:AB020593) の遺伝子配列情報を基にブラストサーチ相同性検索ソフトウェアを用いて解析し、相同性の認められる配列を見出した。該クローンの全塩基配列を決定した結果、プラスミド hep10314には配列番号 2 に記載された塩基配列の塩基番号 406 番目からの約 2.1kbの cDNA が含まれ、配列番号 1 に記載された新規ポリペプチド中の339アミノ酸がコードされていた。

該配列情報をもとに配列番号 9 および配列番号 10 に記載されたDNAプライマーを設計し、Human Pancreas Marathon-Ready cDNA キット (クロンテック社製) を用いて、以下に示す方法によりN末領域をPCR増幅した。

即ち、Human Pancreas Marathon-Ready cDNA 2 μ L、配列番号 9 および AP1 (キットに添付) のプライマー各々 0.2 μ mol/L、各成分 200 μ mol/L の dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 混合液、Taq Goldポリメラーゼ (パーキンエルマー社製) 2.5 単位お

よび1×Taq Gold 緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで30秒間、60°Cで2分間の工程を1サイクルとして30サイクル行ない、更に72°Cで8分間加熱した。続いて、得られた該PCR反応液の100倍希釈液 2 μ L、配列番号 10 およびAP2(キットに添付)のプライマー各々0.2 μ mol/L、各成分200 μ mol/LのdNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1×Taq Gold 緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用いて、上記方法で同様にPCRを行なった。

得られた該PCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロース電気泳動により約0.7kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

上記で回収したDNA断片50ngおよびpT7Blue T-Vector(Novagen社製)50ngをDNA Ligation Kit Ver. 2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行なった。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌J M109株を形質転換し、常法によりプラスミドpT-1を得た。

プラスミドpT-1に含まれるDNA断片の塩基配列を常法によって決定することにより、挿入DNA断片は挿入断片中のCla I部位でhep10314のCla I部位と連結可能であることが判明した。連結した塩基配列を配列番号 2 に記載した。該配列には、配列番号 1 に記載された新規ポリペプチドがコードされていた。

また、既知タンパク質配列データベースに対して、該アミノ酸配列のSmith&Waterman検索を行なったところ、PDE5A、PDE10Aファミリーとの相同性が強く検出された。そこで、各々のファミリーからヒトPDE5Aアミノ酸配列(GenBank : CAA06170)、ヒトPDE10Aアミノ酸配列(GenBank : BAA78034)を選択しアライメントを作製した。図 1 にヒトPDE5A配列、図 2 にヒトPDE10A配列とのアライメント結果を示す。PDEに共通したアミノ酸配列であるHDXXHXXXN配列(配列番号 14)も認められた(図 1、図 2 の下線部)。

実施例2：ノーザンハイブリダイゼーションによるmRNAの発現解析

実施例1で決定した塩基配列の情報を基に配列番号11に示される5'端側DNAプライマーと配列番号10に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。得られた2種類のプライマー各々0.2 μ mol/L、実施例1のプラスミド(hep10314)10ng、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、ExTaqポリメラーゼ(宝酒造社製)2.5単位および1 \times ExTaq緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用い、95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行ない、更に72 $^{\circ}$ Cで8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロース電気泳動により約0.2kbのDNA断片が増幅されたことを確認後、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてマニュアルに従ってDNA断片を精製した。

一方、pBluescript II KS(-)(STRATAGENE社製)2 μ gを50mmol/Lトリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L塩化マグネシウム、1mmol/Lジチオスレイトール(以下、DTTと略記する)、100mmol/L塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のEcoRV(宝酒造社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を50mmol/Lトリス-塩酸(pH9.0)、1mmol/L塩化マグネシウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、0.5単位のアルカリホスファターゼ(以下、BAPと略記する)(*E. coli* C75)(宝酒造社製)を加えて60 $^{\circ}$ Cで30分間脱リン酸化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてpBluescript II KS(-)由来のEcoRV-BAP処理断片(3.0kb)を精製した。

- 上記で回収したDNA断片50ngおよびpBluescript II KS(-)由来のEcoRV-BAP処理断片をDNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を

形質転換し、常法によりプラスミドp200を得た。

プラスミドp200の2 μ gを50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のEcoRI(宝酒造社製)とBstXI(宝酒造社製)を加え、37°Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片をDNA Blunting Kit(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌J M109株を形質転換し、常法によりNorthern解析プローブ作製用プラスミドp200-EBを調製した。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を図3に示す。

調製したプラスミドp200-EB 10 μ gを10mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、50mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、30単位のHindIII(宝酒造社製)を加え、37°Cで6時間消化反応を行った。該反応液を用いてフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、DNA断片を回収した。

該DNA断片の1 μ gを、40mmol/Lトリスー塩酸(pH8.0)、6mmol/L 塩化マグネシウム、2mmol/L スペルミジン、10mmol/L DTT、1mmol/L ATP、1mmol/L CTP、1mmol/L GTP、0.65mmol/L UTP、0.35mmol/L ディゴキシゲニン-11-UTPを含む緩衝液50 μ Lに溶解し、40単位のT7 RNAポリメラーゼ(ペーリンガー・マンハイム社製)を添加し、37°Cで2時間in vitro転写反応を行なった。

反応後、得られた該反応液より、エタノール沈殿によりディゴキシゲニン標識cRNAプローブを回収した。

該プローブを用いて、ヒト心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Multiple Tissue Northern Blotsのフィルター(Clontech社製)〕とヒト心臓、脳、肝臓、脾臓、胎盤、肺のpoly(A)⁺ RNAフィルター〔Human Normal Tissue mRNA blot I (Normalized)のフィルター(東洋紡社製)〕に対して、以下に示す条件に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

該フィルターを、50%ホルムアミド、5倍濃度のSSC(1倍濃度のSSCの組成は、

150mmol/L 塩化ナトリウムおよび15mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる)、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDSと略記する)、2% ブロッキング試薬 (ペーリンガーマンハイム社製)、0.1mg/mL サケ精子DNAを含む緩衝液 (以下、ハイブリダイゼーションバッファーと略記する) 中に浸漬し、70°Cで2時間プレハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを、上述のディゴキシゲニン標識cRNAプローブが1 μ g/mLの濃度で溶解しているハイブリダイゼーションバッファーに浸漬し、70°Cで15時間ハイブリダイゼーションを行なった。

該フィルターを2倍濃度のSSC、0.1%SDSよりなる緩衝液中で70°C、10分間浸漬する条件で1回、0.2倍濃度のSSC、0.1%SDSよりなる緩衝液中で70°C、30分間浸漬する条件で3回洗浄した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸 (pH7.5)、150mmol/L 塩化ナトリウムよりなる緩衝液 (以下、DIG I 緩衝液と略記する) 中で室温、15分間浸漬する条件で2回洗浄し、SDSを除去した。

該フィルターを100mmol/L マレイン酸 (pH7.5)、150mmol/L 塩化ナトリウム、1% ブロッキング試薬よりなる緩衝液 (以下、DIGII 緩衝液と略記する) に浸漬し、1時間室温にてブロッキングを行った。

該フィルターを、DIGII 緩衝液で10000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ディゴキシゲニン抗体Fabフラグメント (ペーリンガーマンハイム社製) 溶液中に浸漬し、室温で30分間抗原抗体反応を行った。

該フィルターをDIG I 緩衝液で室温、30分間浸漬する条件で3回洗浄し、余分な抗体を除去した後、100mmol/L トリス-塩酸 (pH9.0)、100mmol/L 塩化ナトリウム、50mmol/L 塩化マグネシウムからなる緩衝液 (以下、DIGIII 緩衝液と略記する) に5分間浸漬し平衡化した。

該フィルターを、DIGIII 緩衝液で100倍に希釈した発光基質CDP-Star (ペーリンガーマンハイム社製) 溶液中に室温で15分間浸漬し、シグナルを発光させ、CCDカメラ (富士写真フィルム社製) で検出した。

結果を図1に示す。膵臓において約2.6キロヌクレオチドのバンドが認められた。

実施例3：GST融合蛋白質発現大腸菌を用いたPDE活性の測定

A. GST融合蛋白質発現用プラスミドの構築

実施例1で取得したDNA断片について、PDE活性を有するアミノ酸配列をコードしていることを確認するため、グルタチオンSトランスフェラーゼ(以下、GSTと略記する)融合蛋白質発現大腸菌を作製した。

実施例1で決定した塩基配列の情報をもとに配列番号12に示される5'端側DNAプライマーと配列番号13に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

得られた2種類のプライマー各々0.2 μ mol/L、実施例1のプラスミド(hep10314)10ng、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、PLATINUM Pfx DNAポリメラーゼ(ライフテック社製)2.5単位および1 \times PLATINUM Pfx DNAポリメラーゼ緩衝液を含む反応溶液50 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行った。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで1分間の工程を1サイクルとして25サイクル行い、更に72 $^{\circ}$ Cで8分間加熱した。

得られた該PCR反応液より5 μ Lを分取し、アガロース電気泳動により約1.0kbのDNA断片が増幅されたことを確認した。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、20mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のBamHI(宝酒造社製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を10mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミンからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のXba I(宝酒造社製)を加えて37 $^{\circ}$ Cで3時間消化反応を

行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI-Xba I断片(1.0kb)を精製した。

一方、プラスミドpVL1393(ファーマンジェン社製)2 μ gを20mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化カリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のBamHIを加え、37°Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を10mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、50mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミンからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のXba Iを加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてBamHI-Xba I断片(9.6kb)を精製した。

上記で回収したPCR増幅BamHI-Xba I断片(1.0kb)50ngおよびpVL1393由来のBamHI-Xba I断片(9.6kb)をDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌J M109株を形質転換し、常法によりプラスミドpPDE-1393を得た。該プラスミドpPDE-1393の2 μ gを50mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミン、0.01% Triton X-100からなる緩衝液50 μ Lに溶解し、それぞれ10単位のCla IおよびNot Iを加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてCla I-Not I断片(1.0kb)を精製した。

実施例1で取得したプラスミドpT-1 2 μ gを50mmol/L トリス-塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、それぞれ10単位のEcoRVおよびCla Iを加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてEcoRV-Cla I (0.3kb)を精製した。

一方、プラスミドpGEX-5X-1(ファルマシア社製)2 μ gを33mmol/L トリス-塩酸

(pH7.9)、10mmol/L 酢酸マグネシウム、0.5mmol/L DTT、66mmol/L 酢酸カリウムからなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のSma Iを加え、30°Cで3時間消化反応を行った。フェノール抽出とエタノール沈殿の後、該DNA断片を50mmol/L トリスー塩酸(pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、100mmol/L 塩化ナトリウム、0.01% ウシ血清アルブミン、0.01% Triton X-100からなる緩衝液50 μ Lに溶解し、10単位のNot Iを加えて37°Cで3時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用いてSma I - Not I断片(5.0kb)を精製した。

上記で回収したpPDE-1393由来のCla I - Not I断片(1.0kb)50ng、pT-1由来のEcoRV - Cla I断片(0.3kb)50ngおよびpGEX-5X-1由来のSma I - Not I断片(5.0kb)50ngをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造社製)を用いてマニュアルに従って結合反応を行った。該反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌J M109株を形質転換し、常法によりプラスミドpGST-PDEを含む大腸菌J M109/pGST-PDE株を得た。該プラスミドの構築過程および制限酵素地図を図5に示す。

B. GST融合蛋白質の大腸菌を用いた発現とPDE活性の測定

200 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地50mLに該大腸菌前培養液(30°C、200 μ g/mLのアンピシリンを含むLB培地で一晚培養)を1/100量加え、25°Cで振とう培養した。OD₅₅₀値が0.5になったところで、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(2mmol/L)を添加し、25°Cで3時間の条件で発現を誘導した。遠心分離(3,000rpmで10分間)により菌体を回収し、抽出液(20mmol/L トリスー酢酸(pH7.5)、2mmol/L 塩化マグネシウム、1mmol/L DTT、250unit/mL アプロチニン、40 μ g/mL フッ化フェニルメチルスルホニル、1 μ g/mL ペプスタチンA)に懸濁して、超音波破碎機(TOMY model UR-200R)を用いて大腸菌を破壊した。上記抽出液を10,000rpmで30分間遠心分離し、上清をPDE活性測定に用いた。

C. PDE活性の測定

PDE活性はKincaid, R.L.とManganiello, V.C.の方法 [Method. Enzymol., 159,

457-470(1988))に従って測定した。 $[^3\text{H}]$ -cAMPまたは $[^3\text{H}]$ -cGMPを基質として300 μL の反応液〔50mmol/LのN,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(pH7.2)、1mmol/L塩化マグネシウム、0.1mmol/Lエチレングリコールビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム〕中で行った。基質濃度は、1 $\mu\text{mol/L}$ とした。反応液を30°Cで15分インキュベートした後、HClを添加して反応を停止した。反応生成物を5'-ヌクレオチダーゼ(シグマ社製)によってアデノシンに変換し、DEAE-Sephadex A-25カラム(ファルマシア社製)で未反応物と分離した。溶出液をシンチレーションバイアルに移し、ウルチマゴールド(Packard社製)を6mL加え、液体シンチレーションカウンター(Beckman LS6500)を用いて放射活性を測定した。非触媒的水解量は、大腸菌可溶性画分を添加しない時の $[^3\text{H}]$ -cAMPおよび $[^3\text{H}]$ -cGMP分解量とした。大腸菌可溶性画分による分解量は全分解量から非触媒的水解量を差し引くことにより求めた。蛋白量は、Bio Rad Protein Assay法を用いて定量した。コントロールとしてプラスミドpGEX-5X-1のみを導入した大腸菌可溶性画分を用いた。結果を図6に示す。

以上、本発明のポリペプチドがcAMP及びcGMPを加水分解するPDE活性を有することが明白となった。

実施例4：PDE活性を有する蛋白質をコードする全長ヒトcDNA断片のクローン化

(1) ヒト胎児腎由来cDNAライブラリーからのクローン化

プラスミドpGST-PDE 30 μg を、20mmol/L トリス-塩酸 (pH8.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化カリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液50 μL に溶解し、40単位のBamHIおよびHpaI (宝酒造社製)を加え、37°Cで4時間消化反応を行った。

該反応液をアガロース電気泳動にかけ、約1kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。精製された該DNA断片を、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)を用いて、ホースラディッシュパーオキシダーゼ標識

し、プローブとして用いた。

該プローブを用いてヒト胎児腎由来cDNAライブラリー(クロンテック社製、商品名: Human Fetal Kidney 5'-STRETCH PLUS cDNA Library) 2×10^5 クローンを用いて、ブランクハイブリダイゼーションを行い、プローブにハイブリダイズする2個の独立したファージクローン(ベクター: λ gt10)を得た(クローン6-1、23-1)。該ハイブリダイゼーションの操作は、全てECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(Amersham社製)のマニュアルに従って行った。該ファージクローンのうちクローン23-1に含まれるcDNA断片を、ファージベクターからプラスミドベクターへ組み換え直した。

該ファージクローン23-1のDNA 20 μ gを、50mmol/L トリス-塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液30 μ L中に溶解し、15単位のEcoRI (宝酒造社製)を添加し、37°Cで4時間消化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、約2kbおよび1kbのDNA断片を回収した。

該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。

pBluescriptII KS(-)(STRATAGENE社製)5 μ gを50mmol/L トリス-塩酸 (pH7.5)、10mmol/L 塩化マグネシウム、100mmol/L 塩化ナトリウム、1mmol/L DTTを含む緩衝液30 μ Lに溶解し、15単位のEcoRI (宝酒造社製)を添加し、37°Cで2時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿によりEcoRI消化DNA断片を回収した。

該DNA断片を50mmol/Lトリス-塩酸 (pH9.0)、1mmol/L塩化マグネシウムを含む緩衝液30 μ Lに溶解し、0.5単位のBAP (*E. coli* C75) (宝酒造社製)を添加し、60°Cで30分間脱リン酸化反応を行った。該反応液をアガロース電気泳動し、約3.0kbのDNA断片を回収した。該DNA断片を、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社製)を用い、マニュアルに従って精製した。

上述のクローン23-1より得られた約2.0kb、約1.0kbのEcoRI DNA断片150ngおよ

びpBluescriptII KS(-)のEcoRI-BAP処理済み断片50ngを66mmol/L トリス-塩酸 (pH7.5)、6.6mmol/L 塩化マグネシウム、10mmol/L DTT、0.1mmol/L アデノシン 3リン酸を含む緩衝液20 μ Lに溶解し、T4 DNAリガーゼ (宝酒造社製) 175単位を添加し、16°Cで16時間結合反応を行った。

該結合反応により得られた組み換えプラスミドDNAを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、常法によりプラスミドp23-1kおよびp23-2kを取得した。

該プラスミドに含まれるcDNA断片の塩基配列を決定した結果、プラスミド p23-1kおよびp23-2kの挿入DNA断片はEcoRI部位で連結可能であり、配列番号 1 6 に記載された約3.0kbのcDNAが含まれ、該cDNAには配列番号 1 5 に記載された576 アミノ酸よりなる新規のポリペプチドがコードされていた。p23-1kおよびp23-2k の構造を図7に示す。

該ポリペプチドが有するアミノ酸配列を、既知のPDE配列と比較したところ、PDE5Aとの高い相同性が認められた。該アミノ酸配列とヒトPDE5Aアミノ酸配列 (GenBank : CAA06170)とのアライメントを図8に示す。

以上の結果から、該配列は新規PDEをコードしていると考えられる。

(2) RT-PCR 法を用いた発現解析

上記した実施例4の(1)で決定した塩基配列の情報を基に配列番号 1 7 に示される5'端側DNAプライマーと配列番号 1 8 に示される3'端側DNAプライマーを設計し、合成した。

2種類のプライマー(配列番号 1 7 および配列番号 1 8)各々1.0 μ mol/L、ヒト組織mRNAから作成したcDNAライブラリー2 μ L、各成分200 μ mol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)混合液、Taq Goldポリメラーゼ(パーキンエルマー社製)2.5単位および1 \times Taq Gold緩衝液(Mg plus)を含む反応溶液20 μ Lを用い、下記条件下でPCRを行なった。

即ち、サーマルサイクラーPTC-200(MJリサーチ社製)を用い、95°Cで10分間加熱後、94°Cで1分間、60°Cで1分間の工程を1サイクルとして38サイクル行い、更に72°Cで8分間加熱した。

得られたPCR反応液より10 μ Lを分取し、アガロース電気泳動により予想される約400bpのDNA断片の増幅を確認した。精巣、前立腺、乳腺、脾臓での発現が認められた。電気泳動結果を図9に示す。

産業上の利用の可能性

本発明により得られる新規PDEポリペプチドのDNAを用いることにより、糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症、悪性腫瘍等の疾患の診断、予防、治療が可能となる。

請求の範囲

1. 配列番号 1 または配列番号 15 に記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド。
2. 請求項 1 に記載のポリペプチドをコードする DNA。
3. 配列番号 2 または配列番号 16 に記載の塩基配列を有する DNA。
4. 請求項 2 又は 3 に記載の DNA を含む組換えベクター。
5. 請求項 4 に記載の組換えベクターを保有する形質転換体。
6. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞から成る群から選ばれる形質転換体である、請求項 5 に記載の形質転換体。
7. 微生物が Escherichia 属に属する微生物である、請求項 6 に記載の形質転換体。
8. 受託番号 FERM BP-6976 を有する、請求項 7 に記載の形質転換体。
9. 請求項 5～8 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を培地で培養し、培養物中に請求項 1 に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、請求項 1 に記載のポリペプチドの製造方法。
10. 請求項 2 または 3 に記載の DNA の塩基配列中の連続した 5～60 塩基と同じ配列を有するセンスオリゴヌクレオチド、該センスオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチド、およびこれらセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド。
11. オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスホロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N 3' - P 5' ホスホアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘

導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体から成る群から選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、請求項10に記載のオリゴヌクレオチド。

12. 請求項10または11に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

13. 請求項10または11に記載のオリゴヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

14. 請求項1に記載のポリペプチドを認識する抗体。

15. 請求項14に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

16. 請求項14に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項1に記載のポリペプチドの免疫組織染色法。

17. 請求項14に記載の抗体を含有する、免疫組織染色剤。

18. 請求項1に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有するホスホジエステラーゼ活性を変動させる化合物のスクリーニング方法。

19. 請求項18に記載の方法により得られる化合物。

20. 請求項1に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング方法。

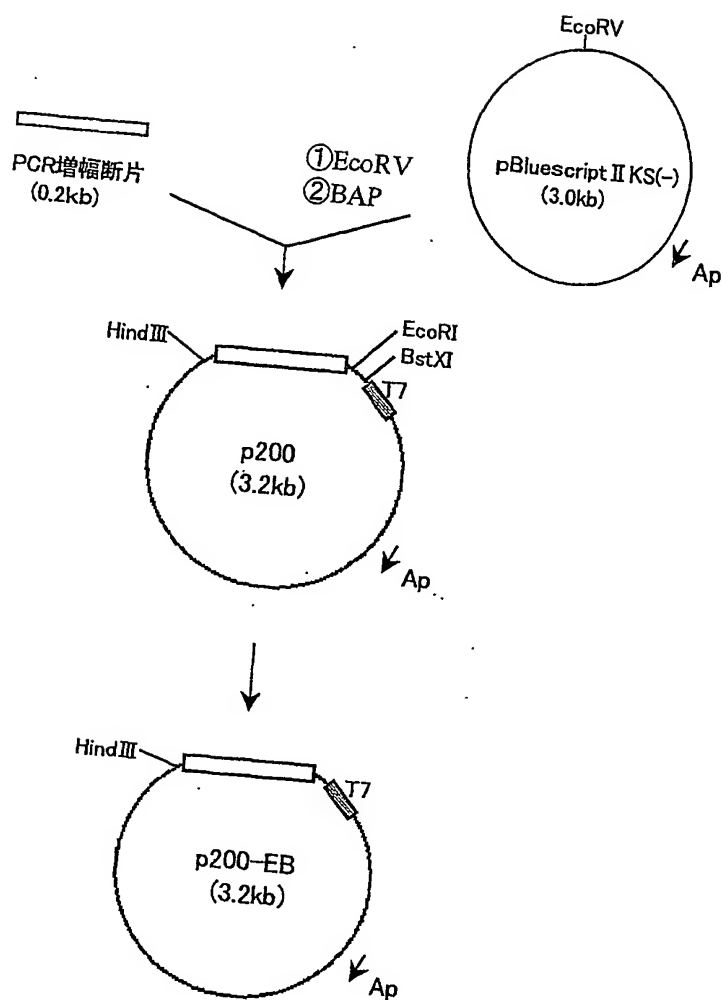
21. 請求項12に記載の方法を用いて請求項1に記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項20に記載のスクリーニング方法。
22. 請求項15に記載の方法を用いて請求項1に記載のポリペプチドを検出することにより、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の変動を検出することを特徴とする、請求項20に記載のスクリーニング方法。
23. 請求項20～22のいずれか1項に記載の方法により得られる化合物。
24. 請求項1に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を制御するプロモーターDNA。
25. 請求項24に記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することとを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング方法。
26. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子から成る群から選ばれる遺伝子である、請求項25に記載のスクリーニング方法。
27. 請求項25または26に記載の方法により得られる化合物。
28. 請求項1に記載のポリペプチドを含有する、医薬。
29. 請求項10または11に記載のオリゴヌクレオチドを含有する、医薬。
30. 請求項14に記載の抗体を含有する、医薬。
31. 請求項19、23または27に記載の化合物を含有する、医薬。
32. 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴

呆、感染、または悪性腫瘍の予防または治療のための医薬である、請求項 28 から 31 の何れか 1 項に記載の医薬。

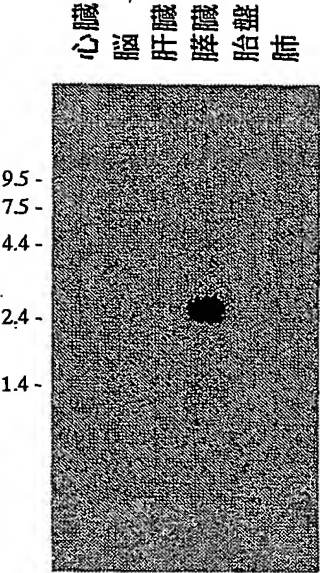
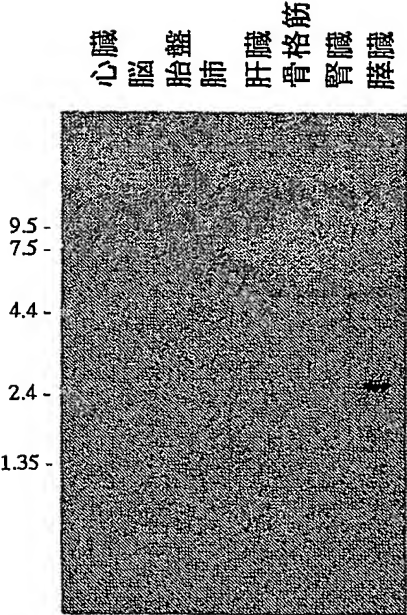
33. 糖尿病、虚血性心疾患、高血圧、腎炎、肺炎、潰瘍、アレルギー、喘息、リウマチ、骨粗鬆症、痛み、不安症、分裂病、躁鬱病、パーキンソン病、痴呆、感染症または悪性腫瘍の診断のための医薬である、請求項 28 から 31 の何れか 1 項に記載の医薬。

[illegible]

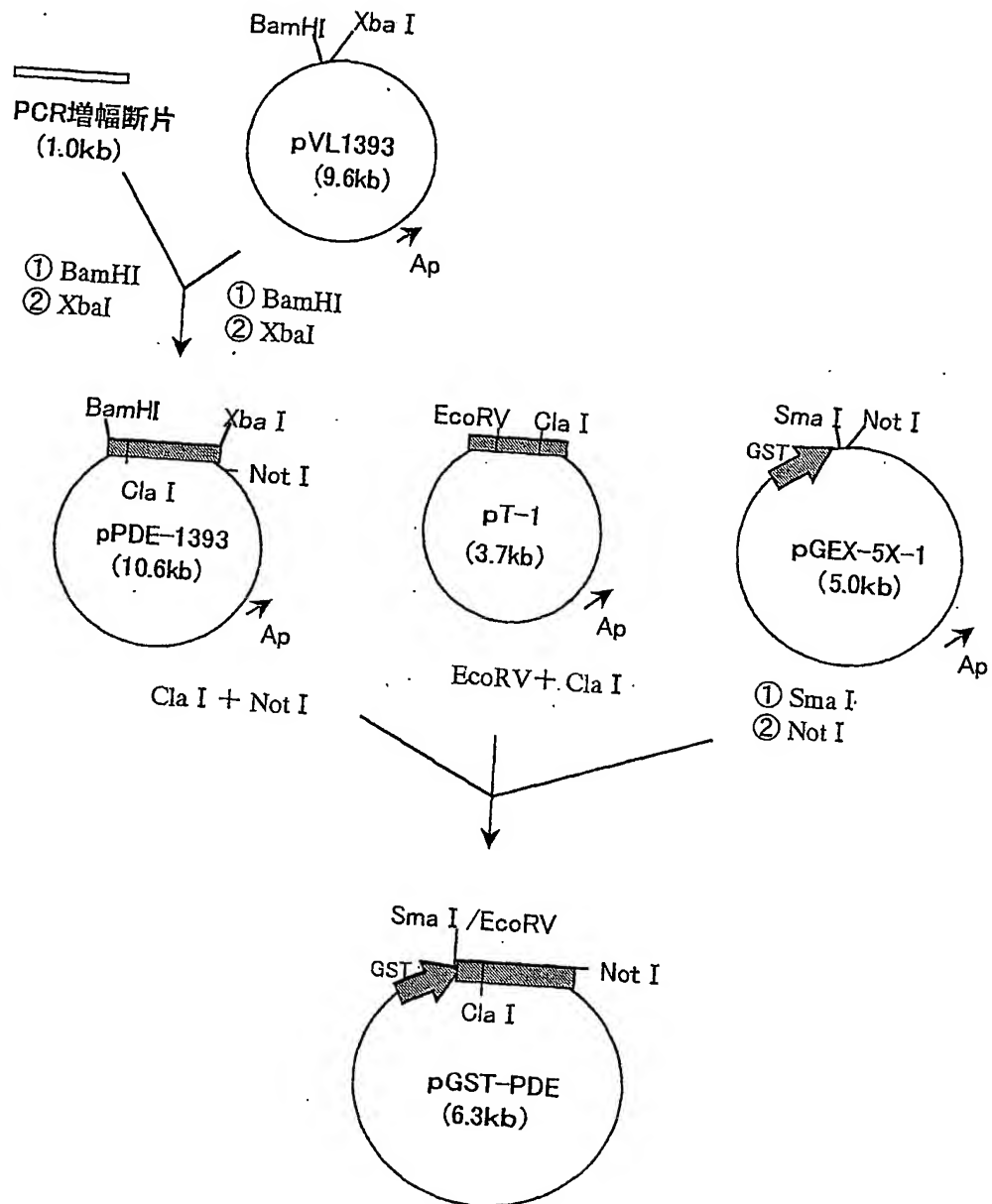
第3図



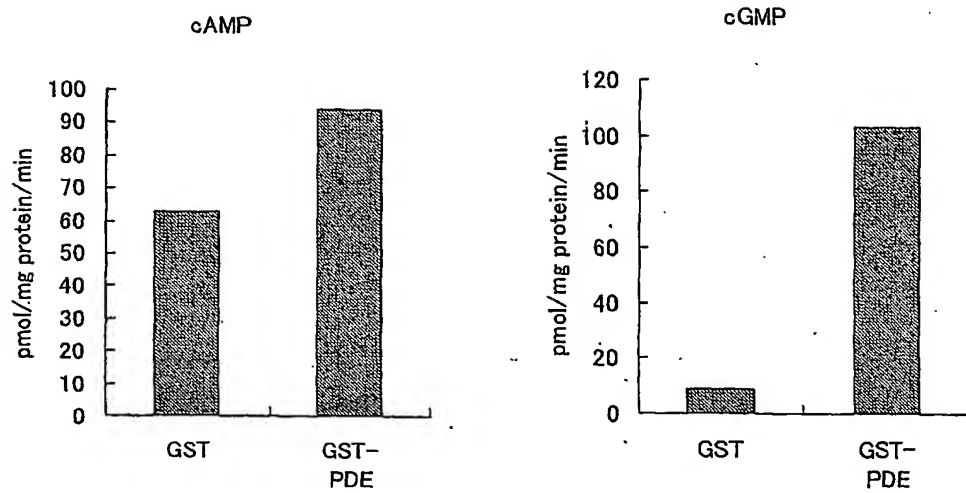
第4図



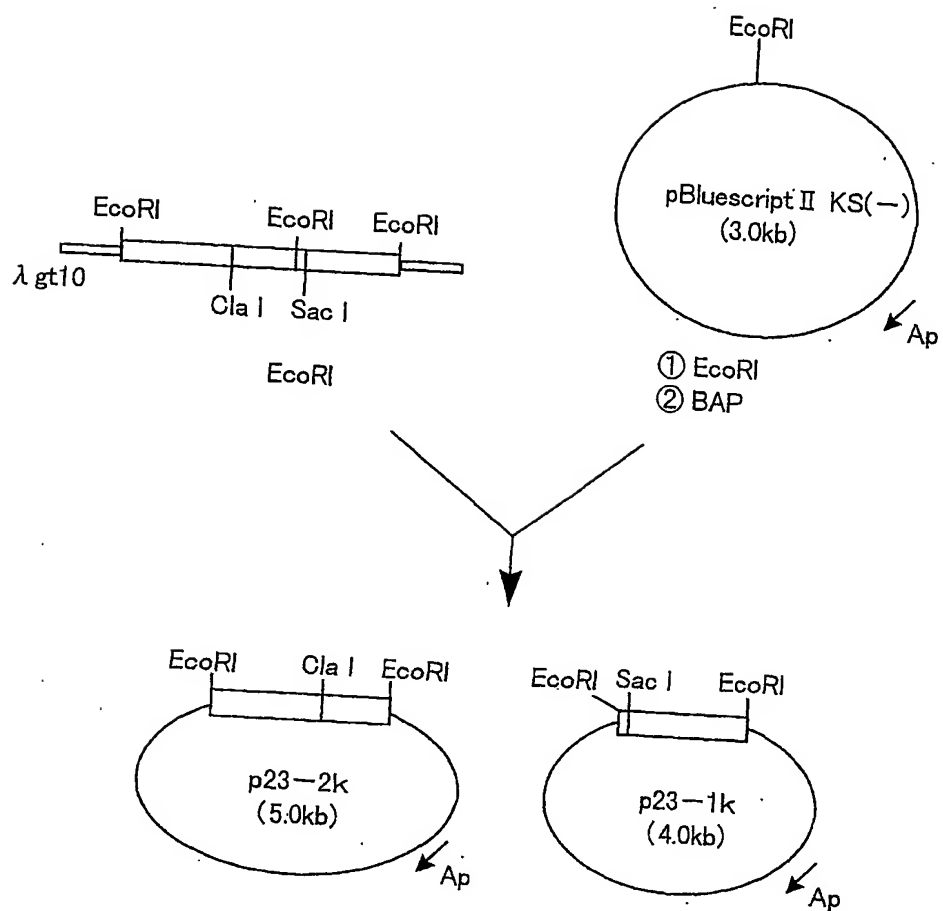
第 5 図



第6図

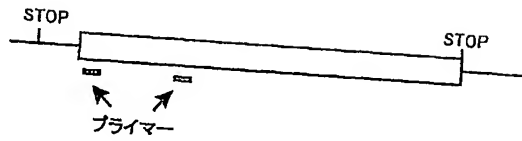


第 7 図

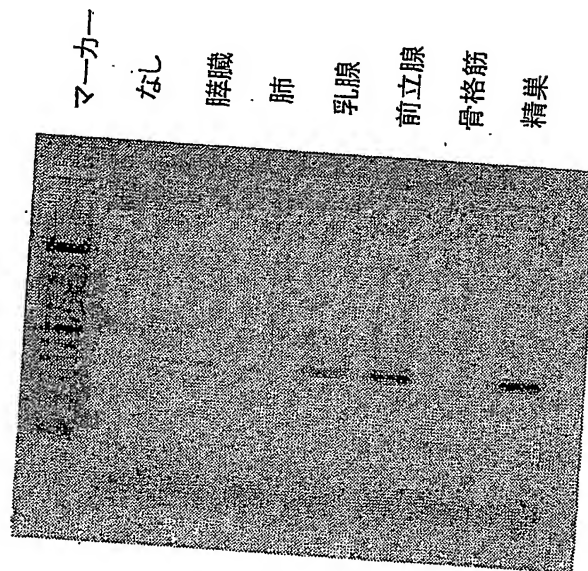


[illegible]

第9図



:クローン23-1



SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A peptide having a phosphodiesterase activity

<130> A11047MA

<160> 18

<210> 1

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala

1 5 10 15

Glu Leu Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr

20 25 30

Gln Asp Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His

35 40 45

Ile Arg Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile

50 55 60

Ile Gly Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp

65 70 75 80

Asp Ala Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu

85 90 95

Gly Ile Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala

100 105 110

Lys Gln Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser

115 120 125

Lys Ala Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser

130	135	140	
Glu Leu Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val			
145	150	155	160
Asp Ala Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met			
165	170	175	
Val Gln Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu			
180	185	190	
Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His			
195	200	205	
Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly			
210	215	220	
Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly			
225	230	235	240
Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln			
245	250	255	
Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr			
260	265	270	
Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu			
275	280	285	
Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu			
290	295	300	
Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr			
305	310	315	320
Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr			
325	330	335	
Asp Trp Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met			
340	345	350	

Thr Ala Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Ile Ser Arg

355

360

365

Gln Val Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg

370

375

380

Glu Arg Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn

385

390

395

400

Arg Lys Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile

405

410

415

Cys Met Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys

420

425

430

Pro Met Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu

435

440

445

His Gln Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala

450

455

460

Ser Val Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn

465

470

<210> 2

<211> 2513

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atg gag aaa tca tca tac tcc gac tgg cta ata aat aac agc att gct 48

Met Glu Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala

1

5

10

15

gag ctg gtt gct tca aca ggc ctt cca gtg aac atc agt gat gcc tac 96

Glu Leu Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr

20

25

30

cag gat ccg cgc tct gat gca gag gca gac cag ata tct ggc ctt cac 144
 Gln Asp Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His
 35 40 45
 ata aga tct gtt ctt tgt gtc cct att tgg aat agc aac cac caa ata 192
 Ile Arg Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile
 50 55 60
 att gga gtg gct caa gtg tta aac aga ctt gat ggg aaa cct ttt gat 240
 Ile Gly Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp
 65 70 75 80
 gat gcg gat caa cga ctt ttt gag gct ttt gtc atc ttt tgt gga ctt 288
 Asp Ala Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu
 85 90 95
 ggc atc aac aac aca att atg tat gat caa gtg aag aag tcc tgg gcc 336
 Gly Ile Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala
 100 105 110
 aag cag tct gtg gct ctt gat gtg cta tca tac cat gca aca tgt tca 384
 Lys Gln Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser
 115 120 125
 aaa gct gaa gtt gac aag ttt aag gca gcc aac atc cct ctg gtg tca 432
 Lys Ala Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser
 130 135 140
 gaa ctt gcc atc gat gac att cat ttt gat gac ttt tct ctc gac gtt 480
 Glu Leu Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val
 145 150 155 160
 gat gcc atg atc aca gct gct ctc cgg atg ttc atg gag ctg ggg atg 528
 Asp Ala Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met
 165 170 175

gta cag ttt aaa att gac tat gag aca ctg tgg agg tgg ctt ttg 576
 Val Gln Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu
 180 185 190
 aca gtg agg aaa aac tat cgg atg gtt cta tac cac aac tgg aga cat 624
 Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His
 195 200 205
 gcc ttc aac gtg tgt cag ctg atg ttc gcg atg tta acc act gct ggg 672
 Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly
 210 215 220
 ttt caa gac att ctg acc gag gtg gaa att tta gcg gtg att gtg gga 720
 Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly
 225 230 235 240
 tgc ctg tgt cat gac ctc gac cac agg gga acc aac aat gcc ttc caa 768
 Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln
 245 250 255
 gct aag agt ggc tct gcc ctg gcc caa ctc tat gga acc tct gct acc 816
 Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr
 260 265 270
 ttg gag cat cac cat ttc aac cac gcc gtg atg atc ctt cag agt gag 864
 Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu
 275 280 285
 ggt cac aat atc ttt gct aac ctg tcc tcc aag gaa tat agt gac ctt 912
 Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu
 290 295 300
 atg cag ctt ttg aag cag tca ata ttg gca aca gac ctc acg ctg tac 960
 Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr
 305 310 315 320

ttt gag agg aga act gaa ttc ttt gaa ctt gtc agt aaa gga gaa tac 1008
 Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr
 325 330 335
 gat tgg aac atc aaa aac cat cgt gat ata ttt cga tca atg tta atg 1056
 Asp Trp Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met
 340 345 350
 aca gcc tgt gac ctt gga gcc gtg acc aaa ccg tgg gag atc tcc aga 1104
 Thr Ala Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Glu Ile Ser Arg
 355 360 365
 cag gtg gca gaa ctt gta acc agt gag ttc ttc gaa caa gga gat cgg 1152
 Gln Val Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg
 370 375 380
 gag aga tta gag ctc aaa ctc act cct tca gca att ttt gat cgg aac 1200
 Glu Arg Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn
 385 390 395 400
 cgg aag gat gaa ctg cct cgg ttg caa ctg gag tgg att gat agc atc 1248
 Arg Lys Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile
 405 410 415
 tgc atg cct ttg tat cag gca ctg gtg aag gtc aac gtg aaa ctg aag 1296
 Cys Met Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys
 420 425 430
 ccg atg cta gat tca gta gct aca aac aga agt aag tgg gaa gag cta 1344
 Pro Met Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu
 435 440 445
 cac caa aaa cga ctg ctg gcc tca act gcc tca tcc tcc tcc cct gcc 1392
 His Gln Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala
 450 455 460

agt gtt atg gta gcc aag gaa gac agg aac taa acc aggt cagctgcagc 1445

Ser Val Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn

465

470

tgcaaaatga ctacagcctg aagggccatt ttcagtcag caatgtcatc cttttgttct 1505
tttagctcag aaagacctaa catctcaagg atgcactggg aacctatgcct gggttttcac 1565
cttgaagcat ggtcagcagc agagagagca acgggaagga caaagaaaga ggtggggcag 1625
ggagcacacc ccaggaccct cacttttccc taatgaacac gcatgggctg aaatgaaggc 1685
tctgggtagg ggactgtttt ggatccaagg acctgtggac agtcggccta cttactctga 1745
gctgagggaa cactgaacag taaaagcgtc attagcgtg cttcattttg tatagggtt 1805
ttctgtttgt tacaagccaa acattgcctg tctttgcttc ccgtccctga atgccttttt 1865
gtgccagact gtcccaagaa tcctaatttg tattccatag aggtatttta tttttaatcc 1925
tagagcttct tattgatgga tcctttagaa ttgcctacct aaaaggtaaa ctatactatc 1985
cttataaata ctgatcaatc ccagttctcc ccctaaaaat gaatacatag taggactata 2045
gcaaatgtgt ttgatgggta attctagact gggactatgg tacccttttc cagagtttta 2105
aaattcaacc ttcgttacag acaaagtttt ctcccagaag gaatggattg atagattttg 2165
attaaagtaa ggggtggaagg aaatctgtag ctggatttac cacaagtgac atctagaaac 2225
tatagttcac aggacagagc agagccatgg agaataagca ttgactacct tgagttctcc 2285
tagtgaggag ttctggtata aaatttaaga ttactaccag taaccaactt aaagcaaact 2345
ataggggtcc ctaatttttg atttttcctt aagtgtgaaga aacaatgctt caaatgttaa 2405
gaaataacag cctgggcgac cagcgagact ccgtctcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2465
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaggg

<210> 3

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 3

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 4

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

cttctgctct aaaagctgcg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

tgtgggaggt tttttctcta

20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cctcactctg aagatcatc a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

gtcaaaagcc acctacacag t

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11

taaggcagct tacatccctc t

21

<210> 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 12

cgggatecccg ccaccatgaa gttaaggca gccaacatc

39

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 13

getctagagccttgaga tgtaggtct

30

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> motif in catalytic core domain of cyclic nucleotide phosphodiesterase

<220>

<222> (3), (4), (6), (7), (8) and (9)

<223> any amino acid

<400> 14

His Asp Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Asn

5

10

<210> 15

<211> 576

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gln Met Tyr Leu Pro Phe Cys Gly Ile Ala Ile Ser Asn Ala Gln

1

5

10

15

Leu Phe Ala Ala Ser Arg Lys Glu Tyr Glu Arg Ser Arg Ala Leu Leu

20

25

30

Glu Val Val Asn Asp Leu Phe Glu Glu Gln Thr Asp Leu Glu Lys Ile

35

40

45

Val Lys Lys Ile Met His Arg Ala Gln Thr Leu Leu Lys Cys Glu Arg

50

55

60

Cys Ser Val Leu Leu Leu Glu Asp Ile Glu Ser Pro Val Val Lys Phe

12/19

Leu Cys Ala Trp Leu Leu Thr Val Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu
 290 295 300
 Tyr His Asn Trp Arg His Ala Phe Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Thr Thr Ala Gly Phe Gln Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile
 325 330 335
 Leu Ala Val Ile Val Gly Cys Leu Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly
 340 345 350
 Thr Asn Asn Ala Phe Gln Ala Lys Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu
 355 360 365
 Tyr Gly Thr Ser Ala Thr Leu Glu His His His Phe Asn His Ala Val
 370 375 380
 Met Ile Leu Gln Ser Glu Gly His Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Glu Tyr Ser Asp Leu Met Gln Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala
 405 410 415
 Thr Asp Leu Thr Leu Tyr Phe Glu Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu
 420 425 430
 Val Ser Lys Gly Glu Tyr Asp Trp Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile
 435 440 445
 Phe Arg Ser Met Leu Met Thr Ala Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys
 450 455 460
 Pro Trp Glu Ile Ser Arg Gln Val Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe
 465 470 475 480
 Phe Glu Gln Gly Asp Arg Glu Arg Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser
 485 490 495
 Ala Ile Phe Asp Arg Asn Arg Lys Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu

500

505

510

Glu Trp Ile Asp Ser Ile Cys Met Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys

515

520

525

Val Asn Val Lys Leu Lys Pro Met Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg

530

535

540

Ser Lys Trp Glu Glu Leu His Gln Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala

545

550

555

560

Ser Ser Ser Ser Pro Ala Ser Val Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn

565

570

575

<210> 16

<211> 2994

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gtgcgtgcgt gcgtgtgtgt gtgtgtgaga gagacacaga gagacataga gtctatgata 60
 taaacatgct tttttccctc ttgctttaga gaagtcctaa gtatgtcact tgtttcatct 120
 acattgcgaa gaatttaggg aaatagttct ttcagttttt acttgagca ttctatctct 180
 ctggaatcag agattctgga gatgaatttc ttgagagtgc aaggcagtag taaaaatccc 240
 tatgcctaaa cctccatgat gagaaagtct ttgttagggg taggcccac acggctgggt 300
 gtttctgccc ataggaggac ttctccatta caggctccca gcctttcctc atcaggttc 360
 tgcagaagca tcccaccagt atgatttgtg tccagttatg tctacacagt ggcagacaca 420
 attagaactc tgtgcagaa ggctgccagg cctgctgacc cctagttccc actgggcca 480
 tcctgacagg catgtttaaa actggtagca gataggtcta gaatcaagct gaaatccctg 540
 ctacagatgt gaattgtatg ccatatacat atggtatatg ccatatgcca acgaaagaat 600
 tgacttatat cctgcctacc tccaaatgtt atg cag atg tat ctt cca ttt tgt 654

Met Gln Met Tyr Leu Pro Phe Cys

1

5

gga atc gga tta tct aac gct cag ctc ttt gct gcc tta agg aaa gaa 702
 Gly Ile Ala Ile Ser Asn Ala Gln Leu Phe Ala Ala Ser Arg Lys Glu
 10 15 20
 tat gaa aga agc aga gct ttg cta gag gtg gtt aat gac ctc ttt gaa 750
 Tyr Glu Arg Ser Arg Ala Leu Leu Glu Val Val Asn Asp Leu Phe Glu
 25 30 35 40
 gaa cag act gac ctg gag aaa att gtc aag aaa ata atg cat cgg gcc 798
 Glu Gln Thr Asp Leu Glu Lys Ile Val Lys Lys Ile Met His Arg Ala
 45 50 55
 caa act ctg ctg aaa tgt gaa cgc tgt tct gtt tta ctc cta gag gac 846
 Gln Thr Leu Leu Lys Cys Glu Arg Cys Ser Val Leu Leu Leu Glu Asp
 60 65 70
 atc gaa tca cca gtg gtg aaa ttt acc aaa tcc ttt gaa ttg atg tcc 894
 Ile Glu Ser Pro Val Val Lys Phe Thr Lys Ser Phe Glu Leu Met Ser
 75 80 85
 cca aag tgc agt gct gat gct gag aac agt ttc aaa gaa agc atg gag 942
 Pro Lys Cys Ser Ala Asp Ala Glu Asn Ser Phe Lys Glu Ser Met Glu
 90 95 100
 aaa tca tca tac tcc gac tgg cta ata aat aac agc att gct gag ctg 990
 Lys Ser Ser Tyr Ser Asp Trp Leu Ile Asn Asn Ser Ile Ala Glu Leu
 105 110 115 120
 gtt gct tca aca ggc ctt cca gtg aac atc agt gat gcc tac cag gat 1038
 Val Ala Ser Thr Gly Leu Pro Val Asn Ile Ser Asp Ala Tyr Gln Asp
 125 130 135
 ccg cgc ttt gat gca gag gca gac cag ata tct ggt ttt cac ata aga 1086
 Pro Arg Phe Asp Ala Glu Ala Asp Gln Ile Ser Gly Phe His Ile Arg
 140 145 150

tct gtt ctt tgt ggc cct att tgg aat agc aac cac caa att att gga 1134
 Ser Val Leu Cys Val Pro Ile Trp Asn Ser Asn His Gln Ile Ile Gly
 155 160 165
 gtg gct caa gtg tta aac aga ctt gat ggg aaa cct ttt gat gat gca 1182
 Val Ala Gln Val Leu Asn Arg Leu Asp Gly Lys Pro Phe Asp Asp Ala
 170 175 180
 gat caa cga ctt ttt gag gct ttt gtc atc ttt tgt gga ctt ggc atc 1230
 Asp Gln Arg Leu Phe Glu Ala Phe Val Ile Phe Cys Gly Leu Gly Ile
 185 190 195 200
 aac aac aca att atg tat gat caa gtg aag aag tcc tgg gcc aag cag 1278
 Asn Asn Thr Ile Met Tyr Asp Gln Val Lys Lys Ser Trp Ala Lys Gln
 205 210 215
 tct gtg gct ctt gat gtg cta tca tac cat gca aca tgt tca aaa gct 1326
 Ser Val Ala Leu Asp Val Leu Ser Tyr His Ala Thr Cys Ser Lys Ala
 220 225 230
 gaa gtt gac aag ttt aag gca gcc aac atc cct ctg gtg tca gaa ctt 1374
 Glu Val Asp Lys Phe Lys Ala Ala Asn Ile Pro Leu Val Ser Glu Leu
 235 240 245
 gcc atc gat gac att cat ttt gat gac ttt tct ctc gac gtt gat gcc 1422
 Ala Ile Asp Asp Ile His Phe Asp Asp Phe Ser Leu Asp Val Asp Ala
 250 255 260
 atg atc aca gct gct ctc cgg atg ttc atg gag ctg ggg atg gta cag 1470
 Met Ile Thr Ala Ala Leu Arg Met Phe Met Glu Leu Gly Met Val Gln
 265 270 275 280
 aaa ttt aaa att gac tat gag aca ctg tgt agg tgg ctt ttg aca gtg 1518
 Lys Phe Lys Ile Asp Tyr Glu Thr Leu Cys Arg Trp Leu Leu Thr Val
 285 290 295

agg aaa aa at cgg atg gtt cta tac cac aac tgg ga cat gcc ttc 1566
 Arg Lys Asn Tyr Arg Met Val Leu Tyr His Asn Trp Arg His Ala Phe
 300 305 310
 aac gtg tgt cag ctg atg ttc gcg atg tta acc act gct ggg ttt caa 1614
 Asn Val Cys Gln Leu Met Phe Ala Met Leu Thr Thr Ala Gly Phe Gln
 315 320 325
 gac att ctg acc gag gtg gaa att tta gcg gtg att gtg gga tgc ctg 1662
 Asp Ile Leu Thr Glu Val Glu Ile Leu Ala Val Ile Val Gly Cys Leu
 330 335 340
 tgt cat gac ctc gac cac agg gga acc aac aat gcc ttc caa gct aag 1710
 Cys His Asp Leu Asp His Arg Gly Thr Asn Asn Ala Phe Gln Ala Lys
 345 350 355 360
 agt ggc tct gcc ctg gcc caa ctc tat gga acc tct gct acc ttg gag 1758
 Ser Gly Ser Ala Leu Ala Gln Leu Tyr Gly Thr Ser Ala Thr Leu Glu
 365 370 375
 cat cac cat ttc aac cac gcc gtg atg atc ctt caa agt gag ggt cac 1806
 His His His Phe Asn His Ala Val Met Ile Leu Gln Ser Glu Gly His
 380 385 390
 aat atc ttt gct aac ctg tcc tcc aag gaa tat agt gac ctt atg cag 1854
 Asn Ile Phe Ala Asn Leu Ser Ser Lys Glu Tyr Ser Asp Leu Met Gln
 395 400 405
 ctt ttg aag cag tca ata ttg gca aca gac ctc acg ctg tac ttt gag 1902
 Leu Leu Lys Gln Ser Ile Leu Ala Thr Asp Leu Thr Leu Tyr Phe Glu
 410 415 420
 agg aga act gaa ttc ttt gaa ctt gtc agt aaa gga gaa tac gat tgg 1950
 Arg Arg Thr Glu Phe Phe Glu Leu Val Ser Lys Gly Glu Tyr Asp Trp
 425 430 435 440

aac atc aaa aac cgc cgt gat ata ttt cga tca atg tta atg aca gcc 1998
 Asn Ile Lys Asn His Arg Asp Ile Phe Arg Ser Met Leu Met Thr Ala
 445 450 455
 tgt gac ctt gga gcc gtg acc aaa ccg tgg gag atc tcc aga cag gtg 2046
 Cys Asp Leu Gly Ala Val Thr Lys Pro Trp Glu Ile Ser Arg Gln Val
 460 465 470
 gca gaa ctt gta acc agt gag ttc ttc gaa caa gga gat cgg gag aga 2094
 Ala Glu Leu Val Thr Ser Glu Phe Phe Glu Gln Gly Asp Arg Glu Arg
 475 480 485
 tta gag ctc aaa ctc act cct tca gca att ttt gat cgg aac cgg aag 2142
 Leu Glu Leu Lys Leu Thr Pro Ser Ala Ile Phe Asp Arg Asn Arg Lys
 490 495 500
 gat gaa ctg cct cgg ttg caa ctg gag tgg att gat agc atc tgc atg 2190
 Asp Glu Leu Pro Arg Leu Gln Leu Glu Trp Ile Asp Ser Ile Cys Met
 505 510 515 520
 cct ttg tat cag gca ctg gtg aag gtc aac gtg aaa ctg aag ccg atg 2238
 Pro Leu Tyr Gln Ala Leu Val Lys Val Asn Val Lys Leu Lys Pro Met
 525 530 535
 cta gat tca gta gct aca aac aga agt aag tgg gaa gag cta cac caa 2286
 Leu Asp Ser Val Ala Thr Asn Arg Ser Lys Trp Glu Glu Leu His Gln
 540 545 550
 aaa cga ctg ctg gcc tca act gcc tca tcc tcc tcc cct gcc agt gtt 2334
 Lys Arg Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ser Pro Ala Ser Val
 555 560 565
 atg gta gcc aag gaa gac agg aac taaacctcca ggtagctgc agctgcaaaa 2388
 Met Val Ala Lys Glu Asp Arg Asn
 570 575

tgactacag tgaaggcc attttcagtc cagcaatgtc atcctttgt tcttttagct 2448
 cagaaagacc taacatctca aggatgcact gggaaccatg cctgggcttt cacettgaag 2508
 catggtcagc agcagagaga gcaacgggaa ggacaaagaa agaggtgggg cagggagcac 2568
 accccaggac cctcactttt ccctaataa cagcatggg ctgaaatgaa ggctctgggt 2628
 aggggactgt tttggatcca aggacctgtg gacagtcggc ctacttactc tgagctgagg 2688
 gaacactgaa cagtaaaagc gtcattagcg ctgcttcatt ttgtataggg cttttctgtt 2748
 tgttacaagc caaacattgc ctgtctttgc ttcccgccc tgaatgcctt tttgtgccag 2808
 actgtcccaa gaatcctaatt ttgtattcca tagaggattt ttatttttaa tcctagagct 2868
 tcttattgat ggatccttta gaattgccta cctaaaaggt aaactatact atccttataa 2928
 atactgatca atcccagttc tccccctaaa aatgaataca tagtaggact atagcaaatg 2988
 tgtttg 2994

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

tgaagaacag actgacctgg a 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

gtcgttgatc cgcacatca 20

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名(名称) 協和醗酵工業株式会社
取締役社長 平田 正
寄託者 あて名 殿
東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli JM109/hep10314	(受託番号) FERM BP- 6976
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成11年12月22日(原寄託日)に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 そして、 年 月 日(原寄託日)に1欄の微生物を受領した。 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshiki Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市1-3 (郵便番号305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p>	
平成11年(1999)12月22日	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01720

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/09, 15/12, 15/55, 9/22, 1/21, C12Q1/68, 1/02, C07K16/40, A61K38/46, 39/395, 31/711		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/09-15/90, 9/22, 1/21, C12Q1/68, 1/02, C07K16/40, A61K38/46, 39/395, 31/711		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.268, No.2, (February 2000), Ching-Shwun Lin et al., "Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene", pp.596-602	24-26 1-18, 20-22, 28-30
P, X	WO, 00/40733, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.), 13 July, 2000 (13.07.00) & US, 6100037, A & AU, 200027217, A	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
P, X	The Journal of Biological Chemistry, Vol.275, No.40, (October 2000), Keizo Yuasa et al., "Isolation and Characterization of Two Novel Phosphodiesterase PDE11A Variants Showing Unique Structure and Tissue-specific Expression", pp.31469-31479	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
P, X	Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol.97, No.7, (March 2000) Lindsay Fawcett et al., "Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A", pp.3702-3707	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 16 May, 2001 (16.05.01)	Date of mailing of the international search report 29 May, 2001 (29.05.01)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

/JP01/01720

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.247, No.2, (1998), Peter Stacey et al., "Molecular Cloning and Expression of Human cGMP-Binding cGMP-Specific Phosphodiesterase (PDE5)", pp.249-254	1-18,20-22, 24-26,28-30
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol.267, No.26, (1992), David R.Repaske, et al., "A Polymerase Chain Reaction Strategy to Identify and Clone Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase cDNAs", pp.18683-18688	1-18,20-22, 24-26,28-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01720

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 19,23,27,31-33
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "compounds" in the above claims, the description discloses no particular compound but merely a generally employed method for isolating a substance changing the phosphorylase activity of the polypeptide according to the invention or a substance changing the promoter activity of the gene encoding the polypeptide according to the invention. Thus, it is unknown what particular substances are involved in the scope of the "compounds" as described above. Such being the case, it is impossible to practice any meaningful international search on these claims.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of the inventions as set forth in claims 1 to 18, 20 to 22 and 28 to 30 resides in a novel phosphodiesterase. On the other hand, the "special technical feature" of the inventions as set forth in claims 24 to 26 resides in a promoter controlling the expression of this enzyme. However, it is recognized that this promoter is not specially designed for expressing the enzyme but applicable to the expression of other various proteins. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. Therefore, these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

It is therefore recognized that two groups of inventions are described in the claims of the present application.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, 15/12, 15/55, 9/22, 1/21, C12Q1/68, 1/02, C07K16/40, A61K38/46, 39/395, 31/711

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09-15/90, 9/22, 1/21, C12Q1/68, 1/02, C07K16/40, A61K38/46, 39/395, 31/711

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS),
 SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 268, No. 2, (February 2000), Ching-Shwun Lin et al., "Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene", p. 596-602	24-26 /1-18, 20-22, 28-30
P, X	WO, 00/40733, A1 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 13. 7月. 2000 (13. 07. 00) &US, 6100037, A &AU, 200027217, A	1-18, 20-22, 24-26, 28-30

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 01

国際調査報告の発送日

29.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 275, NO. 40, (October 2000), Keizo Yuasa et al., "Isolation and Characterization of Two Novel Phosphodiesterase PDE11A Variants Showing Unique Structure and Tissue-specific Expression", p. 31469-31479	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
P, X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 97, No. 7, (March 2000) Lindsay Fawcett et al., "Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A", p. 3702-3707	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 247, No. 2, (1998), Peter Stacey et al., "Molecular Cloning and Expression of Human cGMP-Binding cGMP-Specific Phosphodiesterase(PDE5)", p. 249-254	1-18, 20-22, 24-26, 28-30
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 267, No. 26, (1992), David R. Repaske, et al., "A Polymerase Chain Reaction Strategy to Identify and Clone Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase cDNAs", p. 18683-18688	1-18, 20-22, 24-26, 28-30

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 19, 23, 27, 31-33 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「化合物」について、明細書には、本発明のポリペプチドのホスホリラーゼ活性を変動させる物質又は本発明のポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター活性を変動させる物質を単離する一般的な方法が記載されているのみであり、具体的な化合物については何ら記載されていない。してみると、上記「化合物」に具体的にどのような物質が含まれるのかが不明であるから、前記請求の範囲について、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-18, 20-22, 28-30の「特別な技術的特徴」は、新規ホスホジエステラーゼに関するものである。一方、請求の範囲24-26の「特別な技術的特徴」は、該酵素の発現を制御するプロモーターに関するものである。しかしながら、該プロモーターは、該酵素を発現させるために特に設計したものではなく、他のさまざまなタンパク質の発現にも適用し得るものであると認められるので、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。
よって、本出願の請求の範囲に記載された発明の数は2と認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)